

Université de Sherbrooke

Production, caractérisation, et effets des ectosomes neutrophiliques humains

Par
Frédéric Allard
Programme d'immunologie

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M. Sc.)
en Immunologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Août 2019

Membres du jury d'évaluation

Dr Patrick P. McDonald (programme d'immunologie)
Dre Claire Dubois (programme d'immunologie)
Dr Fernand-Pierre Gendron (programme de biologie cellulaire)

© Frédéric Allard, 2019

1. Résumé

Les neutrophiles sont une composante incontournable de l'immunité innée. Ils exercent une grande influence sur l'immunité et la mise en place de la réponse inflammatoire. L'étude du neutrophile, de ses multiples réponses fonctionnelles et de ses diverses cascades de signalisation est nécessaire pour approfondir la compréhension des différents mécanismes inflammatoires et immunitaires. Au cours des dernières années, une nouvelle réponse fonctionnelle du neutrophile a été mise en évidence, soit la production de microvésicules (MVs) par bourgeonnement ou autrement dit, d'ectosomes. Lors de la stimulation du neutrophile, leur production augmente rapidement. Il a été également démontré que les ectosomes neutrophiliques modulent les réponses de diverses cellules du système immunitaire, comme les macrophages et les cellules dendritiques. Ceci étant, les mécanismes sous-jacents et les voies de signalisation impliquées sont très mal définis. De plus, les effets des ectosomes neutrophiliques sur les réponses du neutrophile, l'inflammation et la réponse immunitaire restent à élucider.

Dans la présente étude, il a été nécessaire de mettre en place des méthodes fiables pour isoler et identifier ces microvésicules. Des méthodes de centrifugation différentielle et de cytométrie en flux ont été privilégiées. Puis, nous nous sommes intéressés à la cinétique de production des ectosomes neutrophiliques ainsi qu'à leur caractérisation et leurs effets sur le neutrophile humain. Leur formation a été caractérisée par des études avec divers stimuli physiologiques et des inhibiteurs des voies de signalisation. L'effet des ectosomes sur les réponses du neutrophile a été évalué par microscopie en épifluorescence pour la NETose; la cytométrie en flux pour l'effet sur l'apoptose constitutive; et par ELISA pour la production de cytokines. Cette étude, bien que préliminaire, a permis de mettre en place une méthode fiable pour la purification, l'identification et la caractérisation des ectosomes neutrophiliques. De plus, ce projet a permis d'identifier plusieurs effets des ectosomes neutrophiliques sur les neutrophiles humains et de confirmer leurs effets sur d'autres cellules immunitaires comme les macrophages. Ce projet nous a permis de mettre en lumière quelques effets des ectosomes neutrophiliques dans la mise en place de la réponse immunitaire et la résolution de l'inflammation.

Mots-clés : Neutrophiles, Réponses fonctionnelles, Microvésicules, Vésicules extracellulaires, Ectosomes, Résolution de l'inflammation

2. Table des matières

1. Résumé.....	II
2. Table des matières	III
3. Liste des tableaux.....	V
4. Listes des figures	VI
5. Liste des abréviations.....	VII
6. Introduction.....	1
6.1. L'immunité innée et l'immunité adaptative	1
6.2. Les neutrophiles	2
6.2.1. Le recrutement et la migration	3
6.3. L'élimination des pathogènes par le neutrophile	4
6.3.1. La phagocytose	4
6.3.2. Les granules	5
6.3.3. La flambée oxydative	7
6.3.4. La NETose	9
6.4. La régulation des réponses immunitaires et inflammatoires	11
6.4.1. La sécrétion de molécules bioactives.....	11
6.4.2. L'apoptose constitutive	16
6.4.3. La résolution de l'inflammation	17
6.5. La stimulation et la régulation des réponses fonctionnelles du neutrophile	18
6.5.1. Les stimuli du neutrophile.....	18
6.5.2. Les voies de signalisation	20
6.6. Ectosomes (MVs) neutrophiliques.....	23
6.6.1. La biogenèse des ectosomes.....	25
6.6.2. La libération de l'ectosome par fission	27
6.6.3. Mécanismes d'interactions cellulaires des ectosomes	30
6.6.4. Effets connus des vésicules extracellulaires	33
7. Hypothèse et objectifs de recherche.....	36
8. Matériels et méthodes	37
8.1. Réactifs et produits utilisés.....	37
8.1.1. Réactifs fluorescents	37
8.1.2. Inhibiteurs de voies de signalisation.....	37
8.2. Isolement et culture cellulaire	37

8.3.	Production et isolement des ectosomes par stimulation in vivo.....	39
8.4.	Production et isolement des ectosomes par cavitation à l'azote	40
8.5.	Cytométrie en flux.....	40
8.5.1.	Marquage des ectosomes, identification et compte des ectosomes	40
8.5.2.	Spécificité du marquage à la calcéine-AM	41
8.5.3.	Interaction ectosomes/cellules.....	41
8.5.4.	Marquage de l'actine	41
8.5.5.	Effet de l'ajout d'ectosomes sur l'apoptose	42
8.6.	Visualisation de la NETose	42
8.7.	Quantification des chimiokines secrétées	43
8.8.	Confirmation de la présence d'ectosomes dans les échantillons (TEM)	43
8.9.	Analyses statistiques.....	43
9.	Résultats.....	44
9.1.	L'identification des ectosomes neutrophiliques.....	44
9.2.	Isolement et la conservation des ectosomes neutrophiliques	47
9.3.	Cinétique de production des ectosomes neutrophiliques.....	50
9.4.	Inhibition de la production d'ectosomes chez le neutrophile humain.....	53
9.5.	Interactions entre les ectosomes et les neutrophiles.....	55
9.6.	Effet des ectosomes neutrophiliques sur la survie du neutrophile humain.....	56
9.7.	Les ectosomes neutrophiliques et la NETose	58
9.8.	Effet des ectosomes sur la production de cytokines	60
10.	Discussion	62
11.	Conclusion	69
12.	Remerciements.....	71
13.	Références.....	72

3. Liste des tableaux

Tableau 1. Le contenu des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile humain	6
Tableau 2. Liste molécules bioactives produites par le neutrophile humain	15

4. Listes des figures

Figure 1. Migration et transmigration du neutrophile.	4
Figure 2. La synthèse des ROS dans le phagosome du neutrophile humain.	8
Figure 3. Image représentative de NETs <i>in vitro</i>	10
Figure 4. Synthèse des médiateurs lipidiques.....	13
Figure 5. Les voies de signalisation du neutrophile.	23
Figure 6. Les types de vésicules extracellulaires	24
Figure 7. Fission de l'ectosome.	29
Figure 8. Les mécanismes proposés menant à la fission de l'ectosome.	30
Figure 9. Les mécanismes d'interaction des ectosomes.	33
Figure 10. Marquage Wright/Giemsa des neutrophiles et des éosinophiles.....	39
Figure 11. Identification des ectosomes neutrophiliques par cytométrie en flux.	46
Figure 12. Confirmation de la présence de microvésicules par TEM	47
Figure 13. Isolement et la conservation des ectosomes neutrophiliques	49
Figure 14. Cinétique de production des ectosomes neutrophiliques	52
Figure 15. Effets de différents inhibiteurs sur la production d'ectosomes	54
Figure 16. Interaction des ectosomes neutrophiliques et des neutrophiles.....	55
Figure 17. Effet des ectosomes neutrophiliques sur la survie du neutrophile humain	57
Figure 18. Effet des ectosomes neutrophiliques sur la NETose	60
Figure 19. Effet des ectosomes sur la sécrétion d'IL-8 par le neutrophile humain	61

5. Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Akt	Protéine kinase B
ARN	Acide ribonucléique
Bad	<i>Bcl2 associated agonist of cell death</i>
Bax	<i>Bcl2 associated X</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CR	Récepteur du complément
DAMPs	Motif moléculaire associé aux dommages
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECT	Ectosome
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FAS L	FAS ligand
Fc	Région cristallisable du fragment (<i>Fragment crystallizable region</i>)
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
fMLP	N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Ig	Immunoglobuline
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukine
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LTB4	Leucotriène B4
LSM	<i>Lymphocyte separation medium</i>
LPS	Lipopolysaccharides
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>
MPO	Myéloperoxydase
MV	Microvésicule
NADP	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Trap</i>
NO	Oxyde nitrique
p38	<i>p38 mitogen-activated protein kinases</i>
PAF	<i>Platelet-activating factor</i>
PAMPs	Motifs moléculaires associé aux pathogènes
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldéhyde
PG	Prostaglandine
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PMA	Phorbol myristate acétate
PMN	Polymorphonucléaire
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PS	Phosphatidylsérine

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
SHP-1	<i>Small heterodimer partner</i>
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment proteins Receptor
Syk	<i>Spleen Associated Tyrosine Kinase</i>
TAK-1	<i>TGF-β-activated kinase</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor necrosis factor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TX	Thomboxane

6. Introduction

6.1. L'immunité innée et l'immunité adaptative

L'immunité humaine est un sujet complexe et fascinant. On lui reconnaît généralement deux grands volets, soit l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée implique une panoplie de cellules immunitaires, de barrières physiques comme la peau et les muqueuses, ainsi que le système du complément. Le but principal de l'immunité innée est de bloquer les pathogènes en les empêchant d'entrer dans l'organisme (barrières physiques) ou de les éliminer rapidement et de façon non spécifique à l'aide de multiples réponses fonctionnelles comme la phagocytose, la formation de NETs (trappes extracellulaires du neutrophile), et la sécrétion de molécules bioactives. Les cellules de l'immunité innée sont les cellules NK, les mastocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les basophiles, les éosinophiles et les neutrophiles. Parmi celles-ci, les neutrophiles sont généralement les premiers à arriver au site de l'inflammation ou de l'infection. Les cellules de l'immunité innée ont de multiples rôles immunitaires : la présentation d'antigènes, la sécrétion de cytokines et de médiateurs lipidiques, la phagocytose et la résolution de l'inflammation. Bien qu'efficace, la réponse immunitaire innée a ses limites et n'arrive pas toujours à éliminer les pathogènes. Dans cette situation, ses actions permettent de limiter la propagation des pathogènes et de stimuler la réponse immunitaire adaptative (Akira et *al.*, 2006; Turvey et *al.*, 2010; Iwasaki et Medzhitov, 2015).

Contrairement à l'immunité innée, l'immunité adaptative est spécifique. Ses actions requièrent la reconnaissance d'antigènes spécifiques au pathogène à éliminer. Les lymphocytes B et T sont les principaux effecteurs de l'immunité innée. Le rôle principal des lymphocytes B est la sécrétion d'anticorps spécifiques aux pathogènes présents. De plus, le lymphocyte B participe à la présentation d'antigènes, à la régulation de la réponse immunitaire et des différentes cellules, et produit plusieurs cytokines (LeBien et Tedder, 2008). Le lymphocyte T, dépendamment de son sous-type, exerce plusieurs fonctions. Il a une activité cytotoxique via la reconnaissance d'antigènes par les CMH de classe 1 (cellules T CD8+) ou le récepteur CD1d (*Natural Killer T cells* ou NKT), il module la réponse immunitaire et aide à la maturation des autres cellules immunitaires (cellules T CD4+)

(Pennock et *al.*, 2013). De plus, à la suite d'une infection, des cellules B et T à mémoire sont produites. Ces cellules peuvent rapidement produire des anticorps spécifiques et reconnaître les antigènes si le pathogène est à nouveau présent. (LeBien et Tedder, 2008, Pennock et *al.* 2013).

6.2. Les neutrophiles

Bien que les neutrophiles soient demeurés dans l'ombre durant plusieurs décennies en étant considérés comme de simples phagocytes, ils sont maintenant considérés comme des acteurs clés de la réponse immunitaire innée. En effet, ces cellules particulières de la réponse immune représentent entre 50% et 60% des leucocytes circulant dans le sang chez l'humain et leurs actions sont essentielles au recrutement des autres cellules immunes et à l'établissement d'une réponse immunitaire robuste et efficace. De nombreuses études ont permis de mettre à jour ses nombreuses réponses fonctionnelles comme la NETose, la sécrétion de molécules bioactives, et l'ectocytose.

Les neutrophiles appartiennent à la grande famille des granulocytes. Ils sont caractérisés par la présence de granules dans leur cytoplasme. Ces granules contiennent le matériel nécessaire à l'éradication des différentes particules phagocytées (Kobayashi, 2012). Morphologiquement, les neutrophiles ont un diamètre variant de 9 à 15 μm . Leur noyau est aussi polylobé, d'où leur surnom de leucocytes polymorphonucléaires (PMN).

Comme les autres cellules immunitaires, le développement des neutrophiles débute avec les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Ces cellules souches se différencient initialement en cellules progénitrices myéloïdes qui deviendront à leur tour des neutrophiles. Pour que les cellules souches hématopoïétiques et les cellules progénitrices myéloïdes se développent en neutrophiles, elles ont besoin de plusieurs facteurs de croissance comme du G-CSF et du GM-CSF et certaines interleukines (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11) à des moments clés de la différenciation et à des concentrations précises. La différenciation et la maturation du neutrophile humain se font entièrement dans la moelle osseuse (Moreira da Silva et *al.*, 1994; Furze et *al.*, 2014; Lawrence et *al.*, 2018).

Le PMN mature se retrouve dans la circulation sanguine où il a une demi-vie d'environ 6 à 12 heures avant de mourir par apoptose constitutive. Cette courte demi-vie est compensée par l'énorme quantité de neutrophiles produits par le corps humain chaque jour soit, environ 10^{11} neutrophiles. Cependant, cette courte demi-vie augmente considérablement lorsqu'il est activé et qu'il migre hors des vaisseaux sanguins vers les sites inflammatoires ou infectés (Summers et *al.*, 2010; Silvestre-Roig et *al.* 2016; Rosales, 2018).

6.2.1. [Le recrutement et la migration](#)

En conditions normales, les neutrophiles circulent dans les vaisseaux sanguins par un mouvement de roulement sur les cellules endothéliales. Ce mouvement se fait par l'intermédiaire de sélectines spécifiques telles que la P-sélectine et la L-sélectine (Bargatze et *al.*, 1994; Jones et *al.*, 1993). Celles-ci lui permettent d'adhérer faiblement à l'endothélium vasculaire. Lorsque le neutrophile est recruté par les cellules endothéliales activées, le roulement se ralentit puis s'arrête grâce aux intégrines. Chez le neutrophile, on retrouve principalement des β_2 -intégrines ($\beta_2\alpha_M$, $\beta_2\alpha_L$, $\beta_2\alpha_X$) (Langereis, 2013). Ces dernières permettent au neutrophile de ramper sur la surface endothéliale jusqu'à ce qu'il transmigre. La transmigration du PMN, connu sous le nom de diapédèse, est un processus complexe nécessitant l'implication de diverses molécules à sa surface et à la surface des cellules endothéliales. Les multiples lobes du noyau du neutrophile peuvent s'étirer, se contracter et se plier ce qui facilite la diapédèse du neutrophile (Carvalho et *al.*, 2015). Le neutrophile migre toujours vers les gradients de concentration des chimioattractants, que ce soient des facteurs lipidiques, des facteurs microbiens, des DAMPs ou des chimiokines (Mayadas et *al.*, 2014; de Oliveira et *al.*, 2016).

L'exposition à divers stimuli permet l'activation de diverses cascades de signalisation. L'activation de ces cascades conduit à l'activation de diverses molécules effectrices (dont des facteurs de transcription) qui gouvernent les différentes réponses fonctionnelles du neutrophile comme la phagocytose. (Mayadas et *al.*, 2014; de Oliveira et *al.*, 2016).

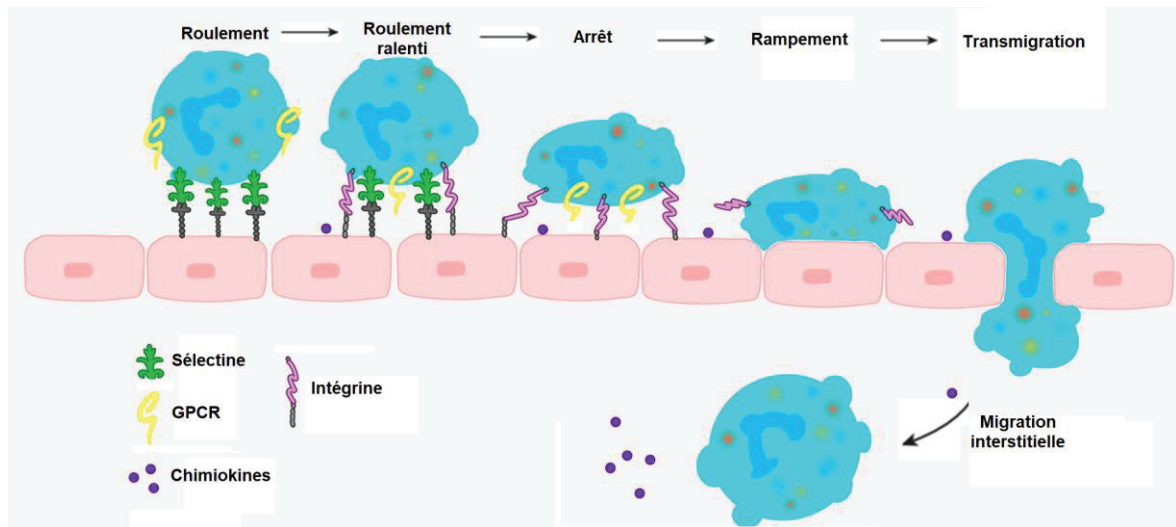


Figure 1. Migration et transmigration du neutrophile.

La migration et la transmigration des neutrophiles vers le site de l'inflammation ou de l'infection se font en plusieurs étapes séquentielles. De plus, ils suivent les gradients de concentration des chimioattractants. Image de : Quirion, Audrey, 2019 ©. (de Oliveira et *al.*, 2016)

6.3. L'élimination des pathogènes par le neutrophile

6.3.1. La phagocytose

Le neutrophile a d'abord été reconnu pour son rôle de phagocyte. Il peut phagocyter une multitude de particules qu'elles soient d'origine organique ou inorganique. Pour les particules inorganiques comme l'amiante, la silice, ou les cristaux d'urate monosodique, la phagocytose se produit probablement suite à l'interaction entre les charges négatives de la particule et les récepteurs *scavengers* de classe A et B comme il fut décrit chez le macrophage (Nakayama, 2018). Pour les particules organiques, il y a plusieurs mécanismes possibles pour initier la phagocytose, et elles dépendent des molécules reconnues à leur surface. Premièrement, il est possible pour le neutrophile de reconnaître des PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes) à l'aide des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) comme les TLRs. Parmi les PAMPs, on retrouve plusieurs sucres bactériens comme le LPS, le D-mannose, le L-fucose, les peptidoglycans, pour n'en nommer que quelques-uns. (Janeway et Medzhitov, 2002; Kumar et *al.*, 2011)

L'opsonisation des pathogènes favorise la phagocytose par le PMN. Un pathogène est opsonisé lorsqu'il est recouvert d'anticorps spécifiques et d'opsonines non spécifiques provenant du système du complément comme C3b, C4b et C1q. La phagocytose des particules opsonisées est possible via la reconnaissance du complément par un récepteur tel que CR1, CR3, CR4 ou par la reconnaissance des portions Fc des Ig par un récepteur spécifique à la surface du neutrophile. Par exemple, à la surface des PMNs humains, on retrouve plusieurs récepteurs de la famille des Fcγ qui se lient plus ou moins fortement aux IgGs. Il y a aussi le FcαR se liant aux IgAs et les FcεRI et FcεRII se liant au IgEs. (Dale et al., 2008; Kumar et al., 2011). La reconnaissance des particules opsonisées ou non par les différents récepteurs du neutrophile active différentes cascades de signalisation incluant celles spécifiques à la phagocytose. L'activation de ces cascades mène à un réarrangement du cytosquelette et de la membrane du neutrophile, ce qui lui permet d'entourer la particule étrangère et de former le phagosome. Les granules du cytoplasme, comme les granules azurophiliques qui sont des lysosomes spécialisés, fusionnent avec le phagosome pour former le phagolysosome (Nordenfelt et Tapper, 2011).

6.3.2. Les granules

Chez le neutrophile, il y a 4 grandes catégories de granules contenant différentes molécules aux propriétés lytiques ou antibactériennes. La classification des granules neutrophiliques est basée sur leur densité et leur contenu. Les granules primaires (ou azurophiliques) sont identifiables grâce à la présence de MPO. Les granules secondaires (ou spécifiques) contiennent de la lactoferrine et sont dépourvues de MPO. Les granules tertiaires ou à gélatinases contiennent une grande concentration de gélatinases mais pas de MPO ou de lactoferrine. Finalement, les vésicules sécrétoires sont riches en plusieurs récepteurs et fusionnent à la membrane du neutrophile lors de son recrutement ce qui augmentera la concentration de plusieurs récepteurs essentiels à sa surface (Borregaard et Cowland, 1997). Le contenu de chacune des granules est détaillé dans le tableau 1.

Tableau 1. Le contenu des granules et des vésicules sécrétoires du neutrophile humain

Type de granules	Molécules de la membrane	Molécules de la matrice
Granules primaires	CD63; CD68; H ⁺ -ATPase de type V	Acide β -glycérophosphatase; α_1 -antitrypsine; α -Mannosidase; Azurocidine/CAP37/ Protéines de liaison à l'héparine; β -Glycérophosphatase; β -Glucuronidase; Cathepsines; Défensines; Élastase; Lysozymes; Mucopolysaccharides acides; Myéloperoxidase; N-Acétyle- β -glycosaminidase; Protéines bactéricides/ augmentant la perméabilité (BPI); Protéinase-3; Sialidase; Ubiquitine
Granules secondaires	Antigène NB1; CD11b/CD18; CD15; CD66; CD67; Cytochrome b ₅₅₈ ; fMLP-R; Fibronectine-R; Sous-unité- α de la protéine G; Laminine-R; protéine de 19 kDa; protéine de 155 kDa; Rap1; Rap2; Récepteur de l'urokinase; SCAMP; Thrombospondine-R; TNF-R; VAMP-2; Vitronectine-R	β_2 -Microglobuline; Collagénase; CRISP-3 (SGP128); Gélatinase; hCAP-18; Histaminase; Héparanase; Lactoferrine; Lysozyme; NGAL; Protéine de liaison à la vitamine B ₁₂ (Transcobalamine-I); Sialidase; Urokinase
Granules tertiaires	CD11b/CD18; Cytochrome b ₅₅₈ ; Enzyme désacylant le diacylglycérol; fMLP-R; H ⁺ -ATPase de type V; Leucolysine; NRAMP-1; Récepteur de l'urokinase; SCAMP; SNAP-23; SNAP-25; VAMP-2;	Acétyltransférase; β_2 -Microglobuline; CRISP-3; Gélatinase; Lysozyme
Vésicules sécrétoires	CD10; CD11b/CD18; CD13; CD14; CD16*; CD45*; C1q-R*; CR1;	Protéines plasmatiques

	Cytochrome b ₅₅₈ ; DAF*; fMLP-R; H ⁺ -ATPase de type V; Leucolysine; Phosphatase alcaline; Récepteur de l'urokinase; VAMP-2;	
--	---	--

* La localisation est basée sur des cinétiques en réponse à une stimulation du neutrophile par des médiateurs inflammatoires et elle n'a pas été démontrée par immunohistochimie. (Modifié de Borregaard and Cowland, 1997)

6.3.3. La flambée oxydative

La formation du phagolysosome amène le neutrophile à augmenter sa consommation d'oxygène et active l'assemblage du complexe de la NADPH oxydase (Reiss et Roos, 1978). Les différentes composantes de la NADPH oxydase sont séquestrées chez le neutrophile au repos. Ainsi, le cytochrome b558 constitué d'une sous-unité gp91^{phox} et d'une sous-unité p22^{phox} se trouve à la membrane des vésicules secondaires et sécrétoires. Dans le cytosol du neutrophile, il y a un complexe formé de trois sous-unités (p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}) et des protéines GTPase Rac2 indépendantes du précédent complexe qui sont nécessaire à la formation du complexe enzymatique de la NADPH oxydase (Nguyen *et al.*, 2017).

Suite à l'activation du neutrophile, les composantes du cytosol transloquent à la membrane du phagolysosome et s'assemblent au cytochrome b558. Le complexe NADPH oxydase permet la synthèse de ROS et la flambée oxydative vers les particules ingérées. (Nguyen *et al.*, 2017). Pour la synthèse des ROS, la NADPH oxydase réduit l'oxygène en anions superoxyde (O₂⁻). Ces anions superoxydes sont ensuite transformés en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sous l'action de la catalase. Les molécules de H₂O₂ sont ensuite transformées en acide hypochloreux (HOCl) par la myéloperoxydase des granules ou en radicaux libres par une réaction de Fenton. (El-Benna *et al.*, 2016)

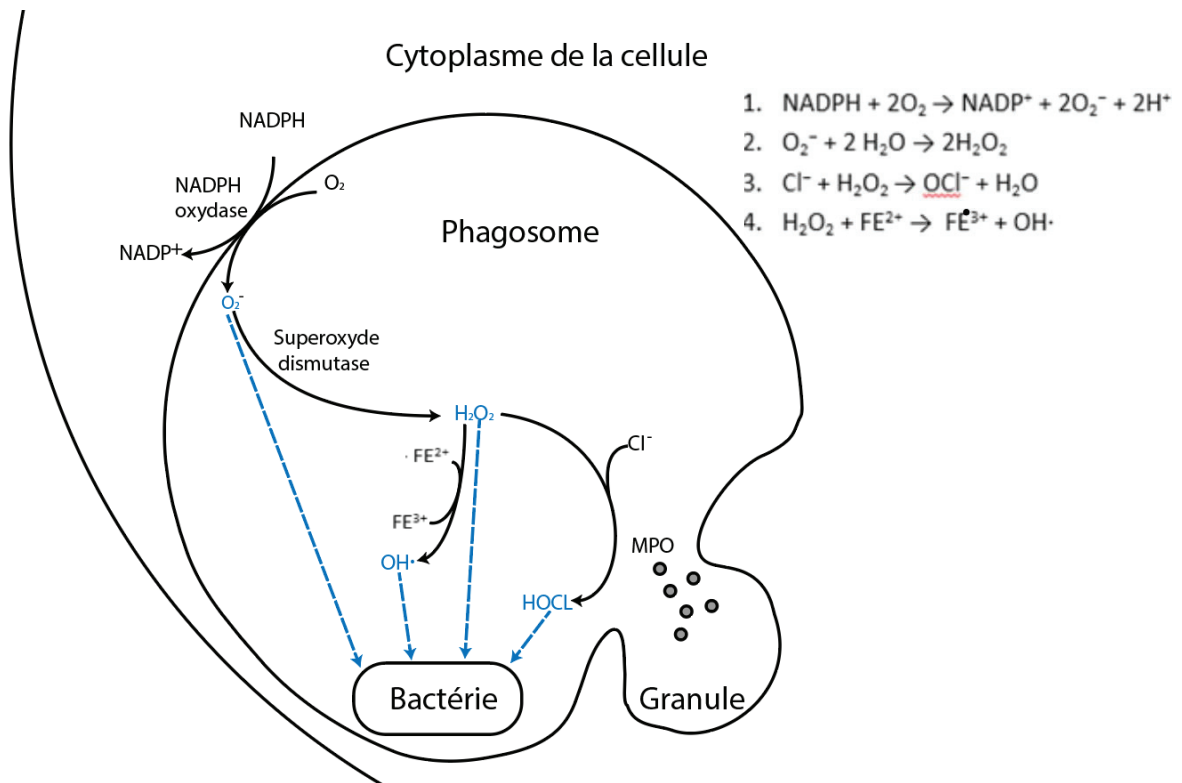


Figure 2. La synthèse des ROS dans le phagosome du neutrophile humain.

Voies de synthèse principales des ROS dans le phagosome du neutrophile humain. (Nauseef, 2007; El-Benna *et al.*, 2016; Nguyen *et al.*, 2017).

Tous ces ROS ont des effets bactéricides et permettent de défendre l'organisme contre différents pathogènes. Cependant, ils sont aussi cytotoxiques et causent des dommages aux tissus environnants ou à la cellule elle-même. Ce qui explique pourquoi leur production est sous une régulation très stricte (Babior, BM., 2000). La flambée oxydative se produit généralement dans le phagolysosome, mais se produit parfois au niveau d'un phagosome immature ce qui signifie qu'elle est alors dirigée vers le milieu extracellulaire. La production de ROS dans le milieu extracellulaire stimule la réponse inflammatoire, la réponse immunitaire et la destruction de pathogènes non-phagocytés. Cependant, cela induit aussi des dommages aux cellules environnantes (Mital *et al.*, 2014; Wang, Jing, 2018).

6.3.4. La NETose

Le neutrophile est l'exemple type de la cellule phagocytaire. Cependant, il peut aussi détruire les pathogènes ou limiter leur propagation en formant des NETs (*neutrophil extracellular traps*) (fig.3). La NETose est une forme de mort cellulaire totalement différente des autres types de morts cellulaires connues comme la pyroptose, l'apoptose et la nécrose (Fuchs et al., 2007; Liu et Sun, 2019). Cette réponse fonctionnelle du neutrophile est induite par la présence de divers stimuli tels que l'IL-8, le fMLP et le PMA (Takei et al., 1996, Brinkmann et al., 2004). Les NETs sont formés principalement de chromatine décondensée qui est projetée dans le milieu extracellulaire environnant. Plusieurs protéines nucléaires comme des histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) et granulaires comme l'élastase, la MPO, la lactoferrine et la gélatinase sont présentes dans les NETs (Brinkmann et al., 2004). Les filaments de chromatine formés dans le milieu extracellulaire sont très adhésifs. Ils servent à circonscrire la réponse immunitaire à un niveau local en capturant et en empêchant la dissémination dans l'organisme des pathogènes ou des molécules de la réponse inflammatoire. Les NETs permettent d'augmenter l'efficacité de la réponse antimicrobienne du neutrophile en immobilisant les micro-organismes. Il a aussi été démontré que les NETs pouvaient détruire les bactéries Gram-positives et Gram-négatives capturées (Brinkmann et al., 2004). La NETose est une forme de mort cellulaire totalement différente des autres types de morts cellulaires connues comme la pyroptose, l'apoptose et la nécrose (Fuchs et al., 2007; Liu et Sun, 2019).

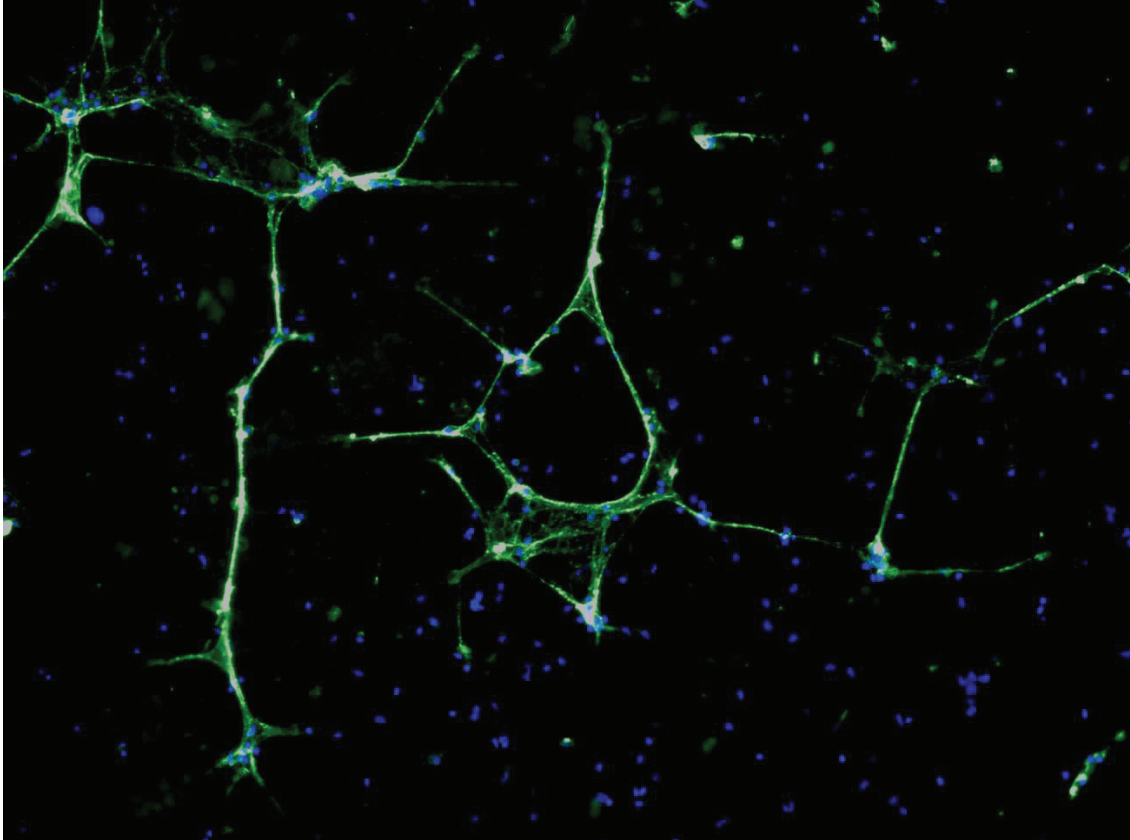


Figure 3. Image représentative de NETs *in vitro*

NETs produits par un stimulation au fMLP 30nM d'une durée de 3 heures et observés par microscopie à épifluorescence à un grossissement de 10x. Les NETs sont marqués en vert avec du PlaNET Green et le noyau des cellules en bleu avec du Hoechst 33342.

Deux types de NETose ont été décrits : la NETose dite vitale et la NETose suicidaire (Yipp et Kubes, 2013). La première forme est généralement rapide (30 à 60 minutes), sans rupture de la membrane cellulaire, mobilise surtout l'ADN d'origine mitochondriale et est provoquée par différents stimuli (Byrd et al., 2013; Yipp et al., 2012). Le neutrophile qui a produit de tels NETs continue à exercer certaines réponses fonctionnelles telles que la phagocytose et la migration (Clark et al., 2007; Yipp et al. 2012). Le second type de NETose est facilement reconnaissable par la rupture de la membrane nucléaire et de la membrane cellulaire. Cette forme de NETose est aussi plus lente que la première, et apparaît quelques heures après la stimulation (Yipp et Kubes, 2013).

Bien que quelques pistes aient été avancées, les mécanismes menant à la formation des NETs son encore mal compris. Par exemple, il a aussi été démontré chez les patients

atteints de CGD (maladie granulomateuse chronique) et dont la NADPH oxydase est défectueuse, que la NETose stimulée par le PMA est incomplète (Fuchs et al., 2007). Il a aussi été montré que des protéines arginines déiminases sont impliquées dans la décondensation de la chromatine lors de la NETose via l'hypercitrullination des histones (H2A, H3, H4) (Wang et al., 2009). Une étude récente du laboratoire a montrée que l'isoforme impliquée est PAD4 et ce, pour diverses classes de stimuli physiologiques (Tatsiy 2018). Cette étude a également mis en évidence les voies de signalisation communes à divers stimuli qui contrôlent le phénomène (Tatsiy 2018). Cependant, malgré toutes les recherches menées sur la NETose, il est difficile d'avoir un portrait global et complet des mécanismes menant à l'extrusion de la chromatine décondensée dans le milieu extracellulaire.

Les réponses fonctionnelles précédemment discutées ont un point commun : elles servent à détruire les pathogènes. Le neutrophile est généralement le premier arrivé sur les lieux de l'infection ou de l'inflammation, et doit pouvoir rapidement intervenir auprès de l'agent infectieux, mais doit aussi pouvoir interagir avec les autres cellules du système immunitaire pour permettre la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

6.4. La régulation de la réponse immunitaire et de la réponse inflammatoire

6.4.1. La sécrétion de molécules bioactives

Comme nous venons de le voir, les neutrophiles ont la capacité de détruire différents agents pathogéniques. Par contre, en tant que premier répondant sur les lieux d'infection ou d'inflammation, ils doivent aussi coordonner le recrutement et la migration d'autres leucocytes. À cette fin, le neutrophile sécrète diverses molécules bioactives qui induisent ou modulent le recrutement et la migration d'autres leucocytes vers le site de l'inflammation. Parmi ces molécules bioactives, il y a des médiateurs lipidiques, des chimiokines, des cytokines pro-inflammatoires, des molécules immunorégulatrices et quelques cytokines anti-inflammatoires (Tecchio et al., 2014; Tamassia et al., 2018).

6.4.1.1. Les médiateurs lipidiques

La synthèse de plusieurs médiateurs lipidiques débute par le clivage de l'acide arachidonique (AA) en position *sn*-2 sur les phospholipides de la membrane nucléaire par la cPLA₂ (Phospholipase A2 cytosolique) (Sapirstein et *al.*, 1995). L'acide arachidonique libéré sert à la synthèse de divers médiateurs lipidiques appelés les eicosanoïdes (fig.4). Parmi ceux-ci, on retrouve le leucotriène B₄ (LTB₄), la prostaglandine E₂ (PGE₂) et la thromboxane A₂ (TXA₂). La synthèse de PGE₂ et de TXA₂ nécessite premièrement l'implication de la cyclooxygénase (COX) pour transformer l'AA en prostaglandine G₂ puis en prostaglandine H₂. La PGH₂ est transformée en PGE₂ à l'aide de prostaglandine E₂ synthase. La PGH₂ est aussi utilisée par le thromboxane synthase pour former la TXA₂ (Samuelson, 1987 ; Hanna et Hafez, 2018). Pour la synthèse du LTB₄, l'acide arachidonique doit d'abord subir deux modifications par la 5-lipoxygénase (5-LO) aidée de la 5-lipoxygénase activating protein (FLAP) pour devenir le LTA₄. Ce dernier est ensuite converti en LTB₄ par le LTA₄ hydrolase (Samuelson, 1987 ; Hanna et Hafez, 2018).

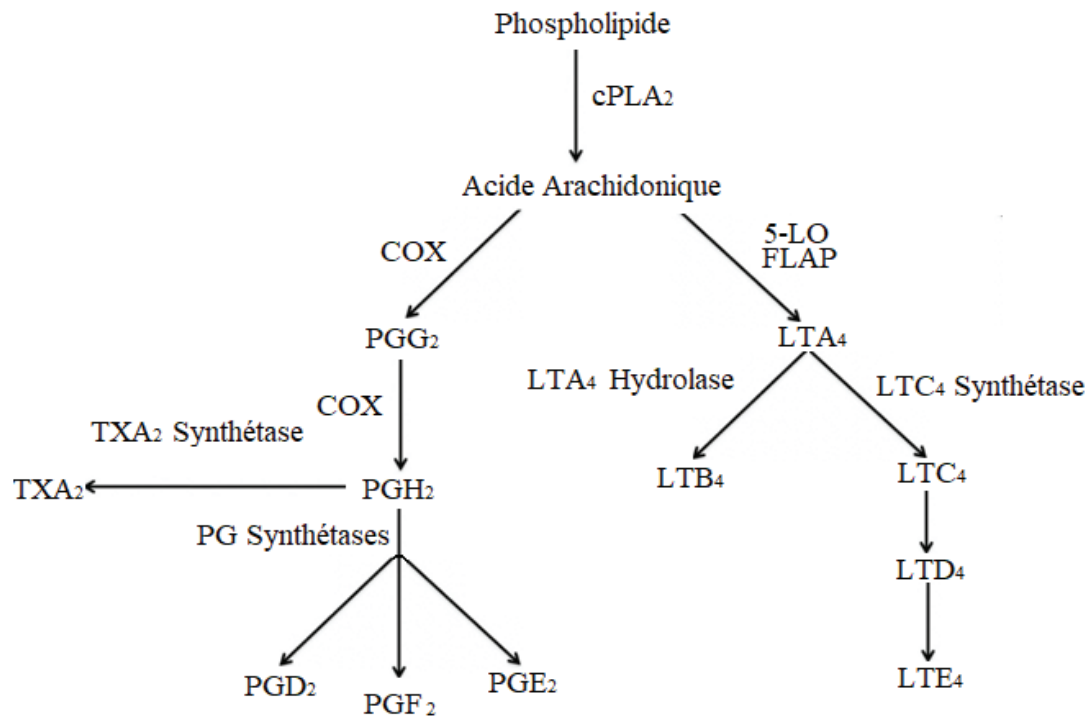


Figure 4. Synthèse des médiateurs lipidiques

Synthèse des eicosanoïdes à partir de l'acide arachidonique chez le neutrophile humain. (Samuelson, 1987, Hanna et Hafez, 2018)

Malgré leur précurseur commun, les effets physiologiques de ces trois médiateurs sont variés et dissemblables. Le LTB₄ induit la chimiotaxie des neutrophiles et influence la formation des ROS (Afonso et *al.*, 2012). La TXA₂ participe au recrutement des plaquettes, favorise leur agrégation et la formation du thrombus (Paul et *al.*, 1999). La PGE₂ exerce des rôles pro- et anti-inflammatoires. En effet, ce médiateur lipidique aide au recrutement des neutrophiles, des mastocytes et des macrophages vers le site inflammatoire, mais elle inhibe l'activité cytotoxique de plusieurs cellules (NKs, macrophages, CTLs) et la synthèse d'IL-2 et de l'IL-2R chez les cellules T (Naknishi et Rosenberg, 2012). En plus des dérivés de l'AA, les neutrophiles peuvent synthétiser d'autres médiateurs lipidiques à partir de précurseurs différents. Il peut par exemple synthétiser du PAF (ou *platelet-activating factor*) à partir de la phosphocholine via la voie de remodelage. La phosphocholine est d'abord transformée en lyso-PAF par la PLA₂. La lyso-PAF est ensuite transformée en PAF par l'action d'une acétyltransférase (Bussolino et *Al.*, 1992).

6.4.1.2. Les cytokines et molécules immunorégulatrices

Le neutrophile sécrète aussi plusieurs molécules immunorégulatrices comme l'IL-12 et l'IFN- γ (Tecchio et *al.*, 2014; Tamassia et *al.*, 2018). L'IL-12 induit la différenciation de CD4⁺ en Th1 et stimule la production d'IFN- γ chez les cellules T, les NKs, les DCs, les macrophages et les neutrophiles (Warford et *al.*, 2003). L'IFN- γ a des effets sur diverses cellules du système immunitaire. Par exemple, il stimule la présentation d'antigènes par les macrophages, cellules B et DCs, la production d'IgG par les cellules B et l'activité cytotoxique des cellules NK et des cellules T CD8⁺ (Shroder et *al.*, 2003).

6.4.1.3. Les chimiokines

Outre les médiateurs lipidiques et les molécules immunorégulatrices. Les PMNs synthétisent une quantité importante de chimiokines comme montré dans le tableau 2. Les

chimiokines produites par le neutrophile sont importantes pour la régulation des réponses immunitaires innée et adaptative. Elles permettent le recrutement des différents types de leucocytes au site inflammatoire. Le neutrophile humain produit, entre autres, de l'IL-8 (CXCL8), du MIP-1 α (CCL3) et du MIP1- β (CCL4) qui sont tous des agents chimiotactiques (Tecchio et *al.*, 2014; Tamassia et *al.*, 2018). L'IL-8 sert principalement au recrutement des neutrophiles et à l'induction de plusieurs cascades de signalisation nécessaires aux diverses réponses fonctionnelles du neutrophile (Bickel, 1993). Le MIP-1 α est un agent chimiotactique pour les monocytes, neutrophiles et macrophages alors que le MIP-1 β permet de recruter les NK, certaines cellules T et les monocytes (Menten et *al.* 2002).

6.4.1.4. Les cytokines pro-inflammatoires

Le neutrophile module aussi la réponse immunitaire en produisant une grande variété de cytokines (tableau 2). Celles-ci permettent de moduler l'inflammation et/ou la réponse immunitaire. Comme montré dans le tableau 2, le neutrophile produit plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-18, l'IL-1 β et le TNF- α (Tecchio et *al.*, 2014; Tamassia et *al.*, 2018; Fortin 2009 pour l'IL-18). L'IL-18 affecte les NKs en stimulant leur activité cytotoxique et la libération de molécules immunorégulatrices comme l'IFN- γ . Il active la différenciation des TH2 et stimule la dégranulation, l'amorçage de la flambée oxydative et la production de plusieurs cytokines chez le neutrophile (Akira, 2000; Leung et *al.*, 2001; Fortin 2009). L'IL-1 β est un pyrogène. Il est nécessaire à la différenciation des Th17. Il induit aussi la résistance de l'organisme face aux divers microorganismes pathogènes via le recrutement des macrophages et des neutrophiles (Dinarello, 2009). Le TNF- α est une cytokine pléiotropique affectant une multitude de cellules immunitaires et non-immunitaires. Pour le neutrophile, le TNF- α stimule plusieurs réponses fonctionnelles comme la phagocytose, la dégranulation, la NETose, et la production de cytokines (Edwards et Hallett, 1997; Keshari et *al.*, 2012). Son rôle a été démontré dans plusieurs maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn, le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde (Richter et *al.*, 1990; Tecchio et *al.*, 2014; Sedger et McDermott, 2014; Kalliolias et Ivashkiv, 2016). En plus du TNF- α , le neutrophile produit aussi plusieurs autres cytokines membres de la superfamille du *tumor*

necrosis factor et qui sont essentielles à la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire (Tecchio et *al.*, 2014; Tamassia et *al.*, 2018).

6.4.1.5. Les cytokines anti-inflammatoires

Malgré son profil très pro-inflammatoire, le neutrophile humain participe aussi à la résolution de l'inflammation via la production de quelques cytokines anti-inflammatoires. Le PMN humain sécrète de l'IL-1ra, de l'IL-18BP et du TGF- β (Tecchio et *al.*, 2014; Tamassia et *al.*, 2018; Fortin 2009). L'IL-1ra inhibe les activités pro-inflammatoires de l'IL-1 en se liant à l'IL-1R avec beaucoup plus d'affinité que l'IL-1 (Arend et *al.*, 1998). L'IL-18BP se lie à l'IL-18 et l'empêche de se lier à son récepteur inhibant ainsi ses effets pro-inflammatoires. (Norvick et *al.*, 1999). Le TGF- β inhibe la prolifération des cellules B et des lymphocytes de type Th2. Chez le macrophage, il inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise le phénotype anti-inflammatoire. Le TGF- β bloque aussi le cycle cellulaire en phase G1 via l'inhibition de la kinase cycline-dépendante (CDK) (Batlle et Massagué, 2019).

Tableau 2. Liste molécules bioactives produites par le neutrophile humain.

Classes de cytokines	Cytokines
Chimiokines C-C	CCL2, CCL3, CCL4, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22
Chimiokines C-X-C	CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11
Cytokines anti-inflammatoires	IL-1ra, IL-18BP, TGF β 1, TGF β 2
Cytokines immunorégulatrices	IL-12, IL-21, IL-23, IL-27, TSLP
Cytokines pro-inflammatoires	G-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-22, MIF
Facteurs angiogéniques et fibrogéniques	Angiopoïétine1, BV8, FGF2, HB-EGF, HGF, TGF α , VEGF

Membres de la superfamille du TNF	APRIL, BAFF, CD30L, CD40L, FasL, Lymphotoxine β , RANKL, TNF α , TRAIL
Autres cytokines	Activine A, Amphiréguline, endothéline; Midkine, Oncostatine M, PBEF

(Tecchio et al., 2014; Tamassia et al., 2018)

6.4.2. L'apoptose constitutive

Tel que décrit précédemment, le neutrophile exerce plusieurs rôles importants dans la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire. Même dans sa principale façon de mourir (i.e. par apoptose constitutive), le neutrophile influence l'homéostasie.

L'apoptose du neutrophile est gérée par un équilibre fragile entre différents signaux pro- et anti-apoptotiques qui favorisent respectivement l'apoptose ou la survie. Chez le neutrophile au repos, il y a une prépondérance de signaux apoptotiques. Suite à une stimulation toutefois, les signaux anti-apoptotiques permettent de retarder l'apoptose (Simon, 2003; Luo et Loison, 2008). Ces différents signaux pro- et anti-apoptotiques activent ou inhibent plusieurs modulateurs apoptotiques intracellulaires comme les ROS, les caspases et SHP-1, et influencent ainsi l'apoptose constitutive du neutrophile (Simon, 2003; Luo et Loison, 2008).

Chez le PMN, il existe plusieurs signaux anti-apoptotiques extracellulaires comme l'adhésion cellulaire, le G-CSF, le LPS et les cellules endothéliales activées sécrétant du GM-CSF. Par exemple, le GM-CSF promeut la survie du neutrophile en stimulant plusieurs voies anti-apoptotiques comme la voie PI3K/Akt (Fortin et al., 2011; Sylvain-Prévost et al., 2015). La stimulation de ces diverses voies anti-apoptotiques favorise la phosphorylation de la protéine Bad sur les résidus sérines 112 et 136 et sa translocation au cytosol (Cowburn et al., 2002; Kobayashi et al., 2005). Suite à sa translocation, Bad ne peut plus inhiber plusieurs protéines anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-x) ce qui inactive Bak et Bax, amène la libération du cytochrome C et l'activation des caspases (Dibbert et al., 1999; Bergmann, 2002).

Les signaux pro-apoptotiques du neutrophile sont la phagocytose, de fortes concentrations de TNF- α , le Fas Ligand et les radiations UV (Vinokurov et *al.*, 2001; Simon, 2003; Croker et *al.*, 2011). La promotion de l'apoptose par la phagocytose est due à la production des ROS. Ces derniers peuvent causer des dommages à l'ADN ce qui mène à l'activation des caspases (Luo et Loison, 2008). Pour les fortes concentrations de TNF- α , le mécanisme est encore mal compris, mais procéderait via TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) et CD137 (un membre de la famille des récepteurs du TNF) (Heinisch et *al.*, 2000; Daigle et Simon, 2001 (2)). Le Fas ligand, quant à lui, induit l'apoptose du neutrophile par l'activation de la caspase-3. Celle-ci interagit avec les caspases 8 et 9 ce amène le clivage de plusieurs protéines telles que DFF-45, α -fodrine et gelsoline, la décondensation et la fragmentation de l'ADN (Porter et *al.*, 1999; Daigle et Simon, 2001(1)). Une concentration élevée de TNF- α et de Fas Ligand entraînent l'activation de SHP-1. SHP-1 est une phosphatase ayant, parmi ces nombreuses fonctions, un effet pro-apoptotique. En effet, SHP-1 inhibe certaines protéines anti-apoptotiques comme Lyn, PI3K et Tyk-2 (Yousefi et Simon, 2003). SHP-1 interagit physiquement avec LYN et la sous-unité p85 de PI3K ce qui cause leur déphosphorylation et leur inhibition (Daigle et *al.*, 2002; Yousefi et Simon, 2003; Chong et Maiese, 2007). Pour Tyk-2, une interaction a été mise en évidence mais, le mécanisme reste à élucider (Yetter et *al.*, 1995; Yousefi et Simon, 2003).

6.4.3. La résolution de l'inflammation

Finalement, le neutrophile apoptotique joue un rôle dans la résolution de l'inflammation. En effet, le neutrophile apoptotique relâche certaines molécules comme sphingosine-1-phosphate (S1P), CX₃CL1 et LPC qui sont des chimioattractants pour les macrophages. Une fois le macrophage recruté, il se lie au neutrophile à l'aide de récepteurs liant la phosphatidylsérine directement ou par l'entremise d'une protéine adaptatrice telle que Gas6, Anx-A1, MFG-E8 (Ortega-Gomez, et *al.*, 2013). Cette double liaison stimule la phagocytose du neutrophile par le macrophage, ce qui provoque un changement phénotypique chez ce dernier. Le macrophage passera alors de pro-inflammatoire à prorésolution. Sa production de CD11b diminue, sa capacité d'efférocytose, c'est-à-dire la phagocytose de cellules apoptotiques, augmente et il a tendance à migrer vers la lymphe. De

plus, il produira du TGF- β et de l'IL-10, deux molécules anti-inflammatoires (Ortega-Gomez, et *al.*, 2013; Greenlee-Wacker, 2016).

6.5. La stimulation et la régulation des réponses fonctionnelles du neutrophile

6.5.1. Les stimuli du neutrophile

Les réponses fonctionnelles du neutrophile discutées dans les pages précédentes sont activées par divers stimuli physiologiques ou pharmacologiques. Les stimuli physiologiques sont regroupés en différentes classes. Il y a les agents chimiotactiques (e.g. fMLP, LTB₄, C5a, chimiokines), les cytokines pro-inflammatoires (e.g. TNF α , IL-1 β , IL-18), les ligands des *Toll-like receptors* (e.g. LPS, peptidoglycane) et les facteurs de croissance (e.g. G-CSF, GM-CSF).

6.5.1.1. *Le fMLP*

Le fMLP (ou N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine) est un tripeptide N-formylé apparenté aux oligopeptides N-formylés produits par certaines bactéries et que l'on retrouve aussi dans les mitochondries. Le fMLP induit plusieurs réponses chez le neutrophile comme la migration, la dégranulation, l'explosion oxydative et la NETose (Hoffstein et *al.*, 1982; Bommakanti et *al.*, 1993; Waddell et *al.*, 1994; Tatsiy et McDonald, 2018). Les récepteurs des peptides formylés sont le FPR1, FPR2 et le FPR3. Chez le neutrophile, on retrouve le FPR1 et le FPR2 seulement (He et Ye, 2017). Les FPR font parti de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR). Le récepteur FPR1 est celui qui a le plus d'affinité pour le fMLP (Dorward et *al.*, 2015; He et Ye, 2017).

6.5.1.2. *Le TNF- α*

Le TNF- α (Tumour necrosis factor- α) est une protéine homotrimérique qui représente le prototype de la superfamille des facteurs de nécrose tumorale. C'est une cytokine pléiotropique qui induit l'inflammation. Elle est produite en grande quantité par les macrophages activés et par la plupart des cellules immunitaires, dont les neutrophiles. Le

TNF est une protéine transmembranaire de type 2 qui est relâchée de la membrane par l'action protéolytique de la métalloprotéinase TACE (Geering et al., 2011; Futosi et al. 2013). Chez le neutrophile il y a plusieurs récepteurs de la superfamille du TNF (TNFRs) : les TNFR-1 et 2 le récepteur Fas, TRAIL R2 et R3, RANK et LT β R (Futosi et al., 2013). Cependant, deux récepteurs seulement peuvent interagir avec le TNF- α , les TNFR1 et 2. Ces deux récepteurs mènent à plusieurs réponses fonctionnelles chez le neutrophile comme la production de cytokines pro-inflammatoires et la NETose (Edwards et Hallett, 1997; Keshari et al., 2012). Il est intéressant de noter que les TNFR1 et 2 induisent une réponse pro-inflammatoire, mais que TNFR1 induit aussi une réponse proapoptotique (Geering et al., 2011; Futosi et al. 2013).

6.5.1.3. *Le GM-CSF*

Le GM-CSF est un facteur de croissance faisant partie de la famille des *colony stimulating factors* comme le G-CSF et le M-CSF. Le GM-CSF est une glycoprotéine monomérique impliquée dans la différenciation des précurseurs myéloïdes en granulocytes et en macrophages dans la moelle osseuse. Le GM-CSF induit plusieurs réponses chez le neutrophile mature, mais il est principalement reconnu pour son effet sur le retard de l'apoptose (Fossati et al., 1998). Il peut aussi servir d'agent d'armorçage pour d'autres stimuli (My-Chan Dang, 1999). Le récepteur du GM-CSF (CD116), exprimé chez le neutrophile, est un hétérodimère formé d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta. La sous-unité alpha a une affinité faible pour le GM-CSF alors que la sous-unité bêta sert principalement à la transduction du signal. Lorsque le récepteur est dimérisé, son affinité pour le GM-CSF devient très élevée. Une fois activée, la transduction du signal par la sous-unité bêta se fait par JAK2, STAT5 et la protéine adaptatrice Shc. (McDonald et al., 1998; Hercus et al., 2009; Hercus et al., 2012)

6.5.1.4. *Le LPS*

Le LPS (lipopolysaccharide ou encore endotoxine) est une molécule retrouvée sur la membrane externe des bactéries Gram-négative. Elle est composée d'un lipide et d'un polysaccharide ayant un antigène O. Cet antigène est reconnu par le complexe formé par

TLR4 (Toll-like receptor 4), MD-2 et CD14 que l'on retrouve à la surface de plusieurs cellules immunitaires, dont le neutrophile. Pour activer le neutrophile, le LPS doit former un complexe avec la LBP (LPS binding protein). Ce complexe lie CD14, lequel aide à transférer le LPS vers la protéine MD-2. La liaison du LPS et de MD-2 promeut la dimérisation de TLR4/MD-2 et induit des changements conformationnels chez TLR4. Ces changements permettent le recrutement de protéines adaptatrices. Cela a pour effet d'activer les voies de signalisation en aval et d'induire les différentes réponses fonctionnelles du neutrophile au LPS. Le LPS induit l'adhérence des neutrophiles, la dégranulation et la production de superoxyde et de diverses cytokines (Remer et al, 2003; Tecchio et al., 2014; Naegelen et al., 2015)

6.5.2. Les voies de signalisation

6.5.2.1. *TAK1*

Les réponses fonctionnelles du neutrophile décrites précédemment sont sous un contrôle très strict. Ainsi, plusieurs des mécanismes impliqués sont sous le contrôle de la MAP3 kinase TAK1 (*TGFβ-activated kinase ou MAP3K7*). Notre laboratoire a démontré que TAK1 joue un rôle crucial dans la régulation de plusieurs réponses fonctionnelles du neutrophile telles que la production de cytokines, le retard de l'apoptose et la NETose (Ear et al., 2010; Fortin et al., 2011; Fortin et al., 2013; Sylvain-Prévost et al., 2015; Simard et al., 2015; Tatsiy et McDonald, 2018). En effet, TAK1 régule plusieurs voies de signalisation telles que celles des MAPKs (MEK/ERK, p38, JNK), la cascade IKK/NF-κB, et la voie PI3K/Akt (Ear et al., 2010; Fortin et al., 2011; Sylvain-Prévost et al., 2015; Simard et al., 2015). La voie TAK1 affecte également des facteurs de transcription, des familles NF-κB, C/EBP, CREB et des intermédiaires traductionnels (Cloutier et al., 2009; Ear et al., 2010; Fortin et al., 2013; Mayer et al., 2013; Sylvain-Prévost et al., 2015). Chez le neutrophile humain, TAK1 est activée par divers stimuli dont des cytokines inflammatoires (TNFα, IL-1β, IL-18), des ligands des TLR (LPS, peptidoglycane), et des facteurs chimiotactiques et de croissance (fMLP, LTB4, PAF, GM-CSF) (Ear et al., 2010; Fortin et al., 2011; Sylvain-Prévost et al., 2015).

6.5.2.2. *p38, MEK/ERK et JNK; les MAPKs*

Parmi les MAPKs jouant un rôle important chez le neutrophile humain, on retrouve p38 et MEK/ERK. Ces dernières voies sont aussi activées par une multitude de stimuli. Chez les neutrophiles activés par le LPS et le TNF- α , la production de cytokines est dépendante des voies p38 MAPK et MEK/ERK qui sont sous le contrôle de TAK1. Cependant, si les neutrophiles sont stimulés avec du GM-CSF et du fMLP, notre laboratoire a démontré que l'effet observé sur la sécrétion de cytokines est dû à l'effet de TAK1 sur MEK/ERK et non sur p38. (Cloutier et *al.*, 2007; Sylvain-Prévost et *al.*, 2015). La p38 MAPK exerce son rôle sur la production de cytokines pro-inflammatoire via la phosphorylation de MSK1 qui mène à l'activation des facteurs de transcription CREB et C/EBP (Mayer et *al.*, 2013)

JNK est une autre MAPK exprimée chez le neutrophile humain. Elle ne semble pas avoir d'effets importants dans la production de cytokines (Cloutier et *al.*, 2003). Cependant, elle aurait un effet sur la survie et la production de superoxydes par les neutrophiles stimulés avec du GM-CSF ou du TNF- α (Kato et *al.*, 2008; Avdi et *al.*, 2001)

6.5.2.3. *PI3K/Akt*

Les MAPKs ne sont pas les seules voies de signalisation sous le contrôle de TAK1 chez le neutrophile. La voie PI3K/Akt est une autre voie sous le contrôle de TAK1. Les PI3K constituent une famille d'enzymes hétérodimériques ayant une sous-unité catalytique et une sous-unité régulatrice. Leur substrat principal est le phosphatidylinositol (PI). Suite à son activation, PI3K change le PIP2 en PIP3. PIP3 se lie à Akt via les domaines PH (plekstrin homology domains). Ces liaisons mènent à un changement conformationnel d'Akt, ce qui permet sa phosphorylation subséquente (Hemmings et Restuccia, 2012). Notre laboratoire a montré que la voie PI3K/Akt était impliquée dans la production de cytokines pro-inflammatoires comme MIP-1 α , MIP-1 β et l'IL-8 (Fortin et *al.*, 2011; Sylvain-Prévost et *al.*, 2015)

6.5.2.4. La voie IKK/NF- κ B

Une autre voie sous le contrôle de TAK1 chez le neutrophile est la voie IKK, qui mène à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B. Chez le neutrophile, les IKK α/β sont constitutivement liés aux TAB1, TAB2, TAB4 et TAK1. De plus, ils se retrouvent à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau (Ear et *al.*, 2005; Ear et *al.*, 2010). Lors de l'activation de TAK1 par des stimuli pro-inflammatoires (LPS, TNF- α , PAMPs, ...), IKK β est phosphorylée au sein d'un complexe formé de TAK1, TAB1, TAB2 et TAB4. L'IKK β activée phosphoryle à son tour I κ B α ce qui mène à la dégradation de cette dernière par le protéasome 26S. La dégradation d'I κ B α libère les dimères de NF- κ B, ce qui leur permet de transloquer au noyau où il active la transcription de plusieurs gènes-cibles (Wang et al., 2001; Ghosh et Karin, 2002; Zhang et al., 2014). Dans la littérature, il a été rapporté que NF- κ B avait un effet sur la survie du neutrophile (Castro-Alcaraz et al., 2002) et la production de cytokines (Ear et al. 2010; Cloutier 2007).

6.5.2.5. Syk et Src

D'autres voies impliquées dans la régulation de certaines réponses fonctionnelles du neutrophile ne sont pas sous le contrôle de TAK1. Par exemple, Syk et les membres de la famille Src sont des tyrosine kinases non-liées à un récepteur (NRTK) comportant plusieurs domaines SH (Src homology domain). Syk a deux domaines SH2 alors que Src a un domaine SH3 et un domaine SH2. Le recrutement de Syk se fait via la liaison des domaines SH2 et des motifs ITAMs (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) se trouvant sur différents récepteurs immuns (Bond et al. 2011). Pour Src, une déphosphorylation de la tyrosine-527 qui libère son domaine SH2 et une autophosphorylation de la tyrosine-416 sont nécessaires à son recrutement (Kaplan et al., 1994; Meng et al., 2014). Leur recrutement mène à des changements conformationnels qui les activent et leur permettent d'exercer leurs activités tyrosine kinase. Chez le neutrophile humain, MNK1, S6K et 4E-BP1 sont sous le contrôle de Syk et Src (Fortin et al., 2013). En accord avec cela, il a aussi été rapporté que l'inhibition de Src et Syk chez le neutrophile activé diminue la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires (Ear et al., 2017). De plus, il a été rapporté que Src et Syk

n'affectent que très peu ou pas du tout la survie du neutrophile humaine suite à son activation avec le GM-CSF ou le LTB4 (Ear et al., 2017).

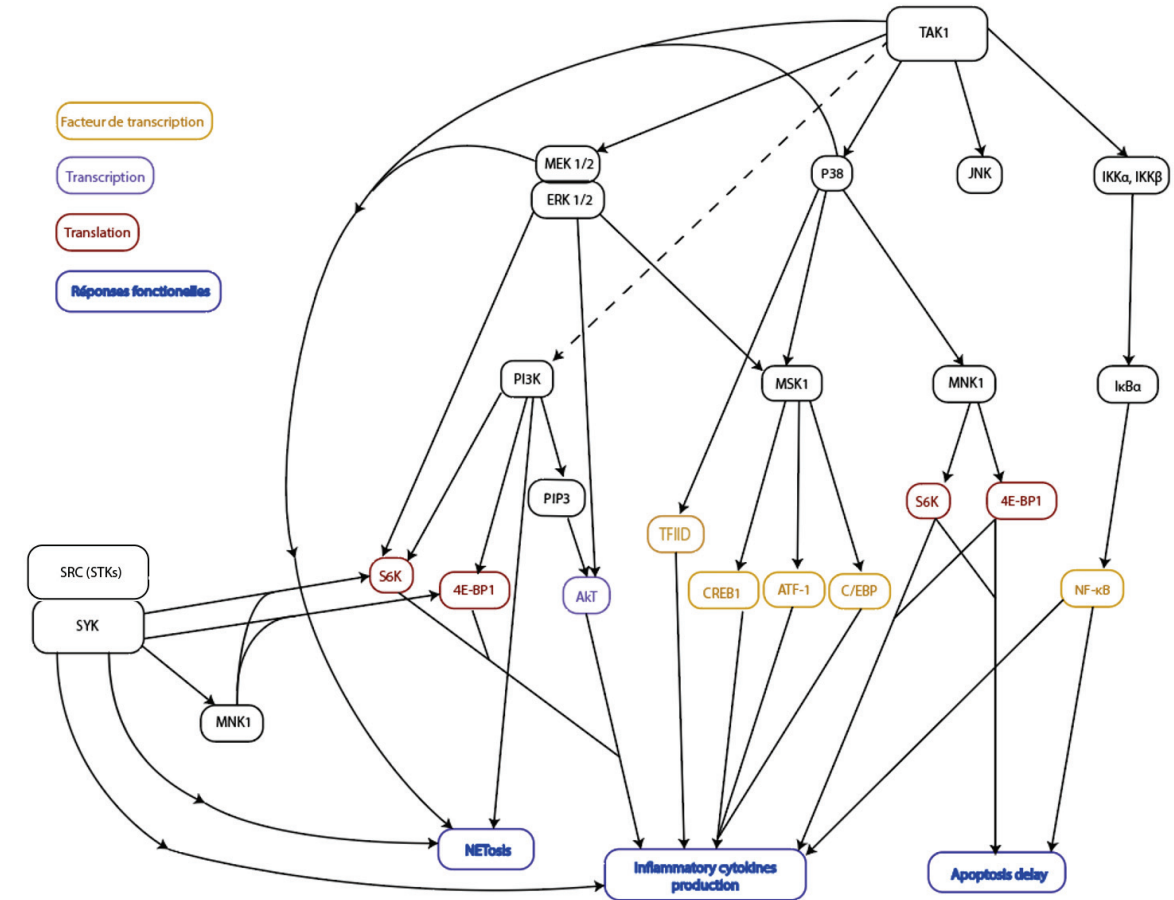


Figure 5. Les voies de signalisation du neutrophile.

Sommaire des différentes voies de signalisation menant à l'apoptose, la production de cytokines inflammatoires ou au délai de l'apoptose chez le neutrophile humaine. (Ear, T. et al., J Immunol, 2010; Fortin, CF et al., Eur J Immunol, 2011; Fortin, CF et al., JLB, 2013; Mayer, TZ et al., J Immunol, 2013; Simard, FA. et al., J leukoc Biol, 2015; Sylvain-Prévost, S. et al., J Immunol., 2015; Ear, T. et al. J Immunol Res, 2017; Tatsiy, O. et al., Front Immunol., 2018)

6.6. Ectosomes (MV) neutrophiliques

Une autre réponse fonctionnelle du neutrophile possiblement sous le contrôle de certaines de ces voies de signalisations a été identifiée au cours des dernières années: la sécrétion de

microvésicules. Plus précisément, le neutrophile produit et relâche des ectosomes dans le milieu extracellulaire. Chez les cellules humaines, il existe trois principaux types de vésicules extracellulaires : les corps apoptotiques, les exosomes et les ectosomes (fig.6).

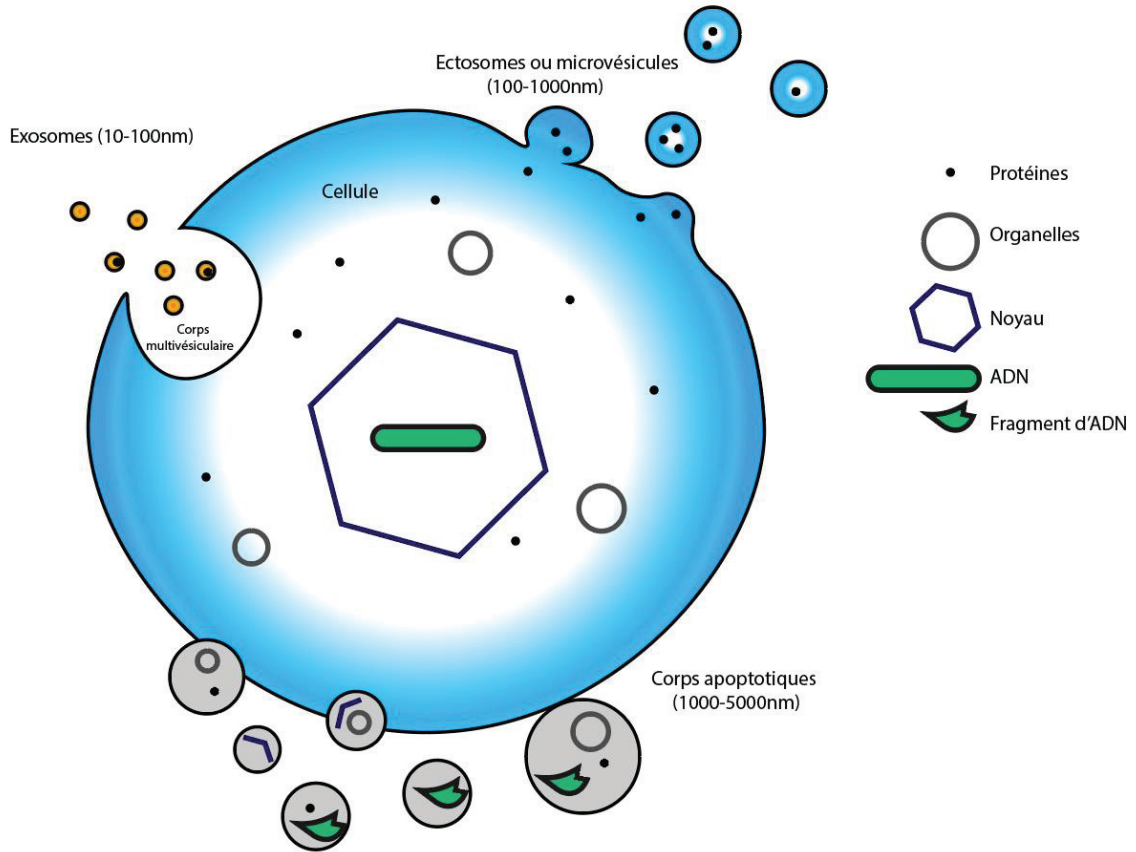


Figure 6. Les types de vésicules extracellulaires

Figure montrant les 3 principaux types de vésicules extracellulaires. Les corps apoptotiques produit par les cellules en apoptose, les ectosomes (ou microvésicules) produit par un bourgeonnement de la membrane cellulaire et les exosomes assemblés dans les corps multivésiculaires (Coccuci et *al.*, 2009; Kalra et *al.* 2016).

Le diamètre des corps apoptotiques varie de 1 à 5 μm . Ils se forment chez les cellules apoptotiques par un bourgeonnement de la membrane cellulaire (*blebbing*) qui est dû à l'instabilité membranaire de la cellule apoptotique. Les corps apoptotiques contiennent des fragments d'ADN, de l'ARN, des organelles et des protéines cytoplasmiques et nucléaires. En d'autres mots, ils recèlent un peu tout ce qui se trouve dans la cellule. Les phosphatidylsérines sont exposées à la surface de la cellule et les marqueurs de surfaces sont semblables à ceux de la cellule de provenance (Raposo et *al.*, 2013; Kalra et *al.* 2016; Xu et

al., 2019). Les neutrophiles produisent des corps apoptotiques lorsqu'ils meurent par apoptose.

Les exosomes sont des vésicules de petite taille (10-100 nm). Leur assemblage se fait dans les corps multivésiculaires de la cellule. Leur mécanisme de sécrétion dans le milieu extracellulaire est l'exocytose. Leur assemblage nécessite le recrutement de nSMase2, des complexes ESCRT et du complexe protéique syndecan-syntenin. Leur transport jusqu'à la membrane nécessite diverses protéines Rab et des kinésines. La fusion au niveau de la membrane et la sécrétion dans le milieu extracellulaire se fait à l'aide des complexes protéiques SNARE (Raposo et *al.*, 2013; Kalra et *al.* 2016). Dernièrement, il a été suggéré que les neutrophiles produisent aussi des exosomes (Vargas et *al.*, 2016; R. Genschmer et *al.*, 2018).

Le troisième type de microvésicules, celui qui nous intéresse, est l'ectosome. L'ectosome est une microvésicule formée à partir du bourgeonnement de la membrane cellulaire. Ces vésicules mesurent de 0.1 à 1 μm de diamètre. Ils contiennent de l'ARNm, des protéines cytoplasmiques et du cytosquelette, de l'ADN et diverses enzymes. Leur contenu spécifique varie en fonction du stimulus menant à leur production (Nauseef et *al.*, 2014). Selon la littérature, l'ectosome neutrophilique peut aussi contenir des granules (Hess et *al.*, 1999). À la surface de l'ectosome neutrophilique, on retrouve plusieurs molécules d'adhésion cellulaire et de migration (DC15, CD66b et CD62L), un récepteur du système du complément (CR3) et un récepteur participant au système du plasminogène (CD87) (Hess et *al.*, 1999; Nauseef et *al.*, 2014; Kalra et *al.*, 2016). Les mécanismes de formation et de sécrétion de l'ectosome sont moins bien connus que ceux de l'exosome, mais voici ce qui a été rapporté dans la littérature.

6.6.1. La biogenèse des ectosomes

Chez les cellules produisant des ectosomes, comme les neutrophiles, peu d'ectosomes sont produits au repos, mais la production est significativement augmentée suite à une stimulation et ce, en quelques minutes seulement (Timár et *al.*, 2013; Johnson III; Hong, 2018). Par exemple, chez le macrophage, il a été montré que la production d'ectosomes

augmente dans les premières secondes suivant une stimulation (Coccuci *et al.*, 2009; Shifrin *et al.*, 2013; Baroni *et al.*, 2007).

Une étude faite chez le monocyte a mis en évidence l'importance des radeaux lipidiques, des domaines membranaires riche en cholestérol, dans le processus d'ectocytose (Del Conde *et al.*, 2005). En effet, en déplaçant les monocytes en cholestérol, la quantité d'ectosomes produits par ceux-ci a diminuée significativement. Cela s'explique par le fait que les radeaux lipidiques augmentent la fluidité de la membrane et permettent l'accentuation de la courbature de la membrane. Cette augmentation de la courbature mène à la formation de l'ectosome par bourgeonnement tout en conservant la double membrane lipidique (del Conde *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2018). De plus, les radeaux lipidiques aident à concentrer et ségréguer les protéines membranaires au niveau de l'ectosome puisque ce sont des domaines qui contiennent un nombre important de récepteurs et de molécules de signalisation. Les protéines ségréguées et leur concentration peuvent varier énormément en fonction du type cellulaire de provenance (Long *et al.*, 2016; Kowal *et al.* 2016; Kalra *et al.*, 2016).

Il y a aussi une ségrégation et un enrichissement des protéines du cytosol de la cellule dans la lumière de l'ectosome (Shen *et al.*, 2011; Meldosi *et al.*, 2018). Les mécanismes de cette ségrégation sont encore mal définis. Un des mécanismes avancés pour les composantes cytoplasmiques est la ségrégation de protéines via des motifs ou des caractéristiques spécifiques. Ces motifs permettent aux protéines de former des liens par myristoylation ou palmitoylation avec un ancrage lipidique membranaire. Leur ségrégation via ce mécanisme dépend principalement de la vitesse de polymérisation du lien avec l'ancrage membranaire. Une fois la protéine ancrée à la membrane de l'ectosome en devenir, elle interagit avec d'autres molécules et forme des complexes avec celles-ci (Shen, *et al.*, 2011). Plusieurs protéines comme les aSmases (sphingomyelinases acide), ARF1, ARF6, MLCK, DIAPH3, Myosin-1a, Annexin-2, hyaluronan synthase 3, CSE1L et Rab22a sont nécessaires au recrutement sélectif de certaines molécules et au remodelage de l'actine, mais leur rôle exact dans la formation de l'ectosome est encore mal compris (Raposo *et al.*, 2013; Coccuci *et al.*, 2015; Kalra *et al.*, 2016; Tricario *et al.* 2017).

Plusieurs complexes et molécules sont nécessaires à la formation de la protubérance au niveau de la membrane cellulaire. Les premières molécules impliquées sont les flippases, les floppases et les scramblases. Leur rôle habituel est de permettre les échanges phospholipidiques entre le feuillet externe et interne de la membrane. Ces échanges maintiennent l'asymétrie dans la composition phospholipidique de la membrane. Dans l'ectocytose, ils augmentent la flexibilité et la courbature de la membrane ce qui est nécessaire au bourgeonnement. Cependant, leur fonction exacte dans le bourgeonnement de la membrane est mal définie. (Raposo *et al.*, 2013; Cocucci et Meldosi, 2015; Kalra *et al.*, 2016; Żmigrodzka *et al.*, 2016; Tricario *et al.* 2017).

6.6.2. [La libération de l'ectosome par fission](#)

Les ectosomes sont libérés dans le milieu extracellulaire par fission de la membrane cellulaire. Le mécanisme est mal défini, mais quelques molécules importantes sont connues (fig.7).

Tout d'abord, il y a un remodelage de l'actine via les protéines Rho, des GTPases de la famille des Ras. Ensuite, ESCRT-I, un hétérotétramère, se lie à la jonction de la membrane cellulaire et de la membrane de l'ectosome en devenir. Sa sous-unité TSG101 interagit avec plusieurs autres protéines comme ARRCDC1 et Alix. Ces deux dernières protéines servent à la ségrégation et à la concentration des protéines cytoplasmiques à l'intérieur du bourgeonnement. ESCRT-I permet le recrutement de plusieurs protéines au niveau de la membrane, dont ESCRT-III (Cocucci et Meldosi, 2015; Kalra *et al.*, 2016; Tricario *et al.* 2017). ESCRT-III est composée de 4 sous-unités principales. La première sous-unité, CHMP3 (VPS24), lie les microfilaments et ESCRT-1. La seconde sous-unité, CHMP6 (VPS20), se lie au niveau du cytoplasme de la cellule et permet le recrutement des autres sous-unités d'ESCRT-III. La troisième sous-unité, CHMP2A (VPS2), permet le recrutement de l'ATPase VPS4 et lie les microfilaments. Les filaments d'ESCRT-III sont composés de 75 à 200 sous-unités CHMP4-A/B/C (Snf7) et forment une spirale. (Chiaruttini et Roux, 2017, Adell *et al.*, 2017; Maity *et al.*, 2019). Chaque type de CHMP4 (A, B ou C) affecte différemment la courbature de la spirale. La spirale formée par les sous-unités CHMP4 de

ESCRT-III se lie aux protéines ALIX et promeut le remodelage de l'actine (McCullough et *al.*, 2008). Cela permet la fermeture de l'ectosome au niveau de la jonction avec la cellule et empêche les protéines ségréguées de s'échapper (Cocucci et Meldosi, 2015).

Finalement, il y a le recrutement de l'ATPase VPS4. L'ATPase VPS4 est une enzyme permettant la dissociation des protéines VPS de classe E et de la membrane. Elle est nécessaire à la ségrégation des protéines dans les corps multivésiculaires. L'ATPase VPS4 permet le relâchement de l'ectosome dans le milieu extracellulaire par fission en clivant ou en désassemblant la spirale formée par ESCRT-III et l'actine. Trois mécanismes d'action sont avancés pour l'ATPase VPS4 soit, la copolymérisation séquentielle, l'échange dynamique et le flambage (Cocucci et Meldosi, 2015; McCullough et *al.*, 2018).

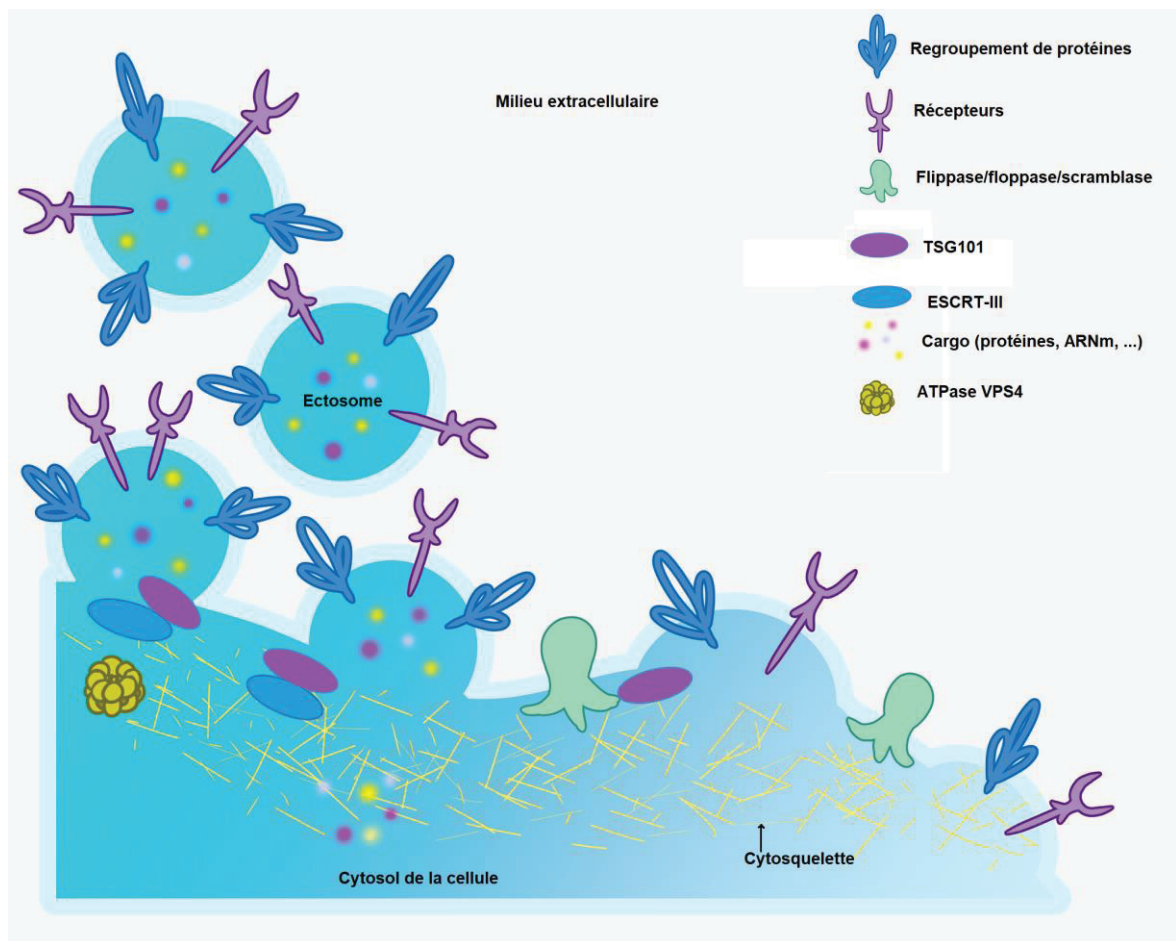


Figure 7. Fission de l'ectosome.

Représentation de la formation de l'ectosome par bourgeonnement, de la ségrégation du cargo dans l'ectosome et du relâchement de l'ectosome par fission dans le milieu extracellulaire (Image de : Quirion, Audrey, 2019; *Cocucci* et Meldosi, 2015; Kalra et *al.*, 2016).

Lors de la copolymérisation séquentielle (fig. 8A), l'ATPase VPS4 incorpore différentes sous-unités CHMP à la spirale de CHMP. Cela accentue la courbature de la spirale puisque chaque sous-unité CHMP a une courbature qui lui est propre. L'ajout de ces sous-unités par VPS4 provoque la polymérisation d'une spirale de plus en plus petite. Cette spirale exerce une force de constriction sur la membrane ce qui provoque la fission et la libération de l'ectosome (Babst et *al.*, 2002; Teis et *al.*, 2008, McCullough et *al.*, 2018). Le second mécanisme est l'échange dynamique (fig. 8B). C'est un mécanisme qui ressemble à la copolymérisation séquentielle, mais l'action de l'ATPase VPS4 s'exerce après la polymérisation de la spirale de CHMP4 plutôt qu'en même temps. L'ATPase VPS4 échange les diverses CHMP de la spirale. Ces échanges affectent la courbature de la spirale ce qui permet la compression de la spirale et la libération de l'ectosome (Yang et *al.*, 2015 Adell et *al.*, 2017; McCullough et *al.*, 2018). Finalement, le dernier mécanisme est le flambage (fig. 8C). Ce mécanisme implique les ESCRT-II qui participent à l'assemblage de plusieurs filaments et recrutent les ATPases VPS4s sous forme d'hexamère (Maity et *al.*, 2019). Les VPS4s se lient aux MIMs (*MIT-interacting motif*) se trouvant sur la sous-unité VPS2 via son domaine MIT (Stuchell-Brereton et *al.*, 2017). Cette liaison permet le remodelage ATP-dépendant des filaments d'ESCRT-III par l'ATPase VPS4. ESCRT-III exerce une force sur la membrane ce qui mène à la formation d'un entonnoir à la jonction entre les membranes de l'ectosome naissant et de la cellule (Schöneberg et *al.*, 2018). L'augmentation de la constriction par l'interaction entre ESCRT-III et VPS4 provoque un amincissement du cou et la fission de l'ectosome (Hanson et *al.*, 2008; Schöneberg et *al.*, 2018; McCullough et *al.*, 2018).

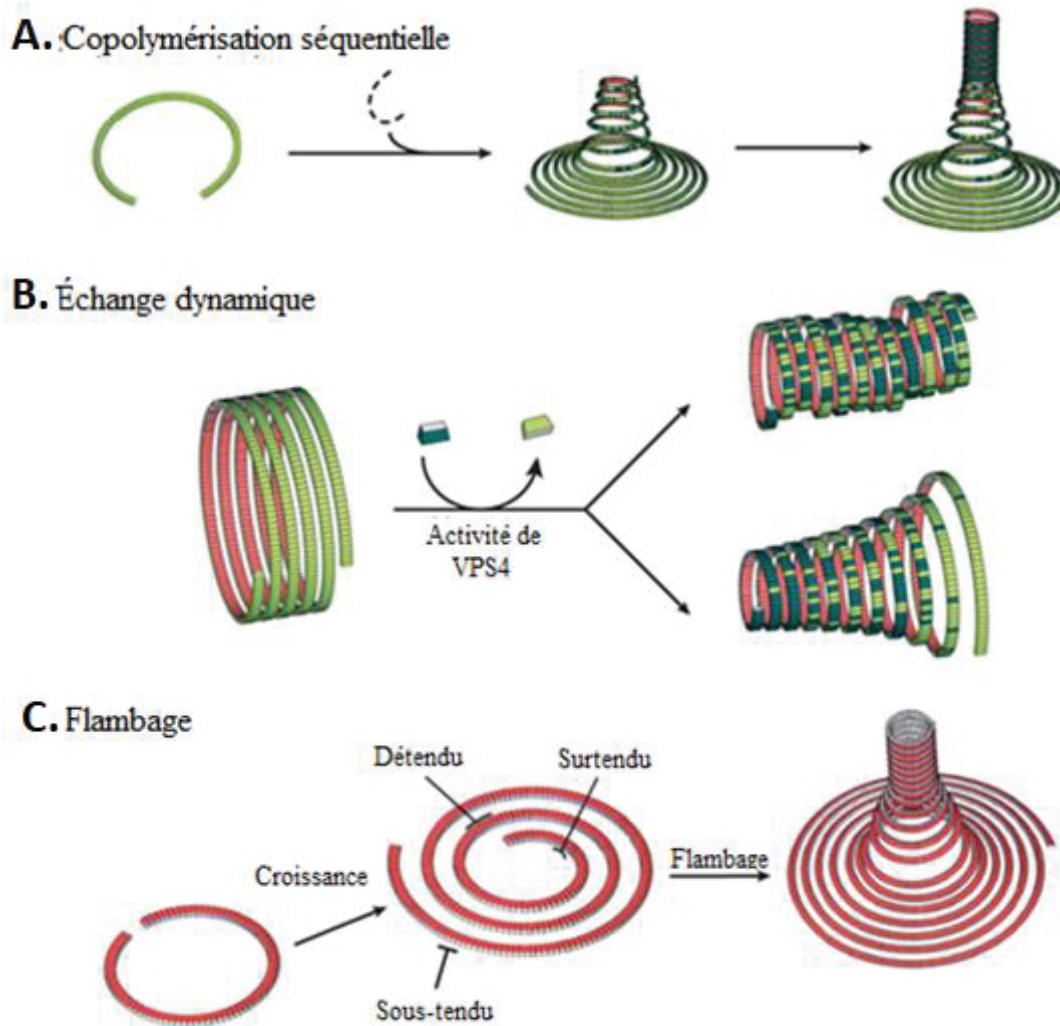


Figure 8. Les mécanismes proposés menant à la fission de l'ectosome.

(Modifiée de Chiaruttini et Roux, 2017)

6.6.3. Mécanismes d'interactions cellulaires des ectosomes

Une fois relâchée dans le milieu extracellulaire, la microvésicule sert à la communication avec les autres cellules (Meldosi, 2018). Le mécanisme exact d'interaction cellulaire n'a pas encore été mis à jour, mais plusieurs scénarios ont été proposés tels qu'illustrés à la figure 9 (Cocucci et Meldosi, 2015; Meldosi, 2018).

Tout d'abord, il peut y avoir une fusion membranaire avec la cellule cible. Ce mécanisme a été décrit chez les trophoblastes placentaires, et nécessite l'implication des syncytines. Ces dernières sont des protéines importantes dans le développement du placenta et leurs gènes proviennent d'anciens rétrovirus. C'est un mécanisme qui est très semblable à celui utilisé par les virus enveloppés impliquant les fusogènes (Vargas et *al.*, 2014; Cocucci et Meldosi, 2015).

Le second mécanisme proposé dans la littérature est l'endocytose médiée par des récepteurs. C'est l'un des mécanismes empruntés par les exosomes et qui est très probablement utilisé par les ectosomes, mais il n'a pas encore été démontré (Tian et *al.*, 2014; Gonda et *al.*, 2018; Meldosi, 2018). Il est possible que certaines protéines à la surface de l'ectosome puissent se lier à des récepteurs à la surface du neutrophile. Suite à leur liaison, des complexes AP-2 sont recrutés au niveau du récepteur. Puis, les complexes AP-2 recrutent des clathrines. La liaison des clathrines au complexe AP-2 provoque une invagination de la membrane cellulaire. L'invagination s'intensifie au fur et à mesure que le nombre de clathrines recrutées augmente, et elle continue jusqu'à l'internalisation de l'ectosome (Cocucci et Meldosi, 2015). C'est un des mécanismes connus dans le cas des exosomes et qui est très probable chez les ectosomes, mais il n'a pas encore été démontré (Meldosi, 2018).

Le troisième mécanisme d'interaction mis en évidence est celui de l'ingestion des ectosomes par des cellules phagocytaires comme les neutrophiles et les macrophages. Ce mécanisme est plausible puisque la perte de l'asymétrie membranaire chez les ectosomes expose les phosphatidylsérines à leur surface. Ces phosphatidylsérines exposées sont un stimulus connu de l'efférocytose (Wu et *al.*, 2006). Ce type de phagocytose est un mécanisme d'interaction déjà connu dans le cas d'autres types de vésicules extracellulaires comme les corps apoptotiques (Cocucci et Meldosi, 2015; Meldosi, 2018).

Le quatrième mécanisme d'interaction possible est la liaison avec des récepteurs de surface spécifiques de la cellule cible sans internalisation de l'ectosome. Il a déjà été démontré que les molécules exposées à la surface des ectosomes varient en fonction du type de cellules les produisant ou du stimulus provoquant leur production (Cocucci et Meldosi,

2011). Cette variété de molécules de surface permet aux ectosomes d'interagir avec différentes cellules cibles. C'est un mécanisme plausible qui pourrait être favorisé par la ségrégation de plusieurs molécules de surface dans les radeaux lipidiques, mais qui n'a pas été démontré (Cocucci et Meldosi, 2015; Meldosi, 2018).

Le cinquième mécanisme mis en évidence est la macropinocytose. Cette dernière est semblable à l'endocytose médiée par des récepteurs, mais l'adhésion du ligand au récepteur spécifique à la surface de la cellule mène à l'augmentation de la polymérisation des filaments d'actine près de la membrane cellulaire et au remodelage de l'actine, ce qui provoque la formation d'une projection membranaire entourant la microvésicule. Cela permet l'internalisation de l'ectosome ou sa fusion avec la projection pour former un macropinosome (Tian et *al.*, 2014; Cocucci et Meldosi, 2015).

Le dernier mécanisme évoqué, et le plus controversé, est le *fading* ou l'évanouissement. C'est un mécanisme évoqué dans la littérature et très peu d'explications sur le fonctionnement de ce mécanisme sont disponibles. Pour ce mécanisme, les ectosomes disparaissent dans le milieu extracellulaire (probablement par une rupture de la membrane) et relâchent leur contenu dans le milieu extracellulaire (Cocucci et Meldosi, 2015). Leurs composantes pourraient ainsi interagir avec plusieurs cellules environnantes plutôt qu'une seule. Cependant, il est probable que ce ne soit pas un mécanisme d'interaction, mais plutôt une instabilité de la membrane de certaines microvésicules qui provoquent la rupture de celle-ci et le relâchement de leur contenu dans le milieu extracellulaire (Cocucci et Meldosi, 2015; Meldosi, 2018).

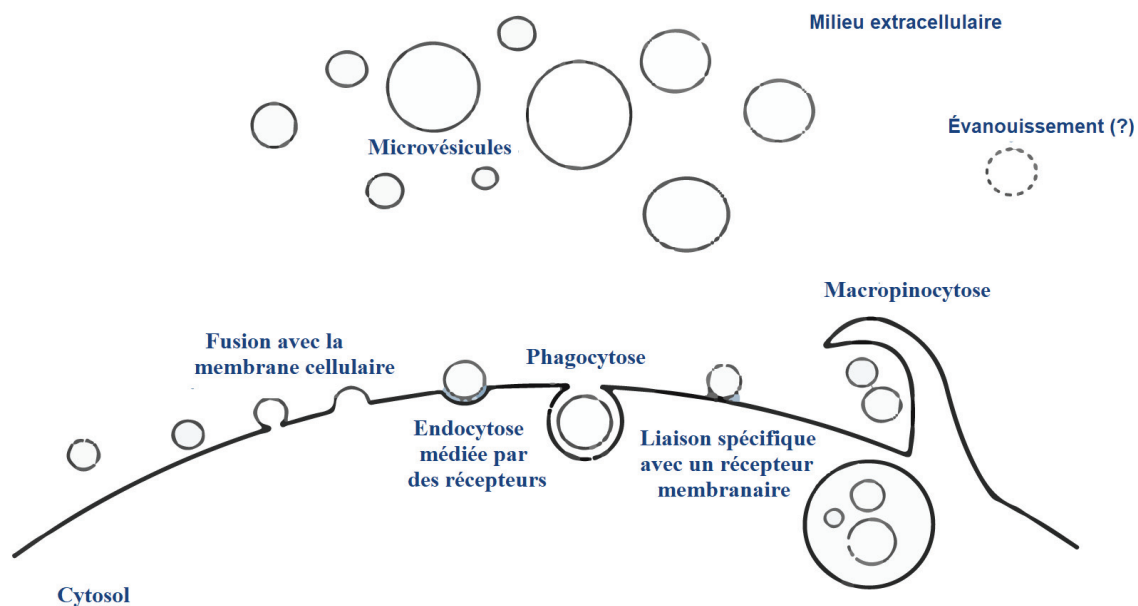


Figure 9. Les mécanismes d'interaction des ectosomes.

Illustration des différents mécanismes d'interactions possibles des ectosomes avec leur cellule-cible. Il y a la fusion avec la membrane cellulaire, l'endocytose médiée par des récepteurs, la phagocytose, la liaison spécifique avec un récepteur membranaire de la cellule, la macropinocytose et l'évanouissement. (Cocucci et Meldosi, 2015; Meldosi, 2018)

6.6.4. Effets connus des vésicules extracellulaires

En interagissant avec leur cellule cible, les ectosomes et les autres microvésicules ont des effets sur celle-ci et sur son environnement. La majorité des cellules immunitaires produisent au moins un type de vésicule extracellulaire. La plupart des vésicules produites par les cellules immunitaires sont des exosomes et jouent un rôle important dans la communication intercellulaire. Par exemple, les exosomes produits par les mastocytes et les macrophages peuvent transférer des antigènes vers les APCs (cellules présentatrices d'antigènes) (Gutiérrez-Vázquez, 2013). Les cellules dendritiques produisent des exosomes possédant des CMH-II apprêtés d'un antigène pour présenter les antigènes aux cellules B et T (Wang et Lu, 2017; Gutiérrez-Vázquez, 2013). Certaines cellules immunitaires produisent des ectosomes plutôt que des exosomes. C'est le cas des neutrophiles.

Les ectosomes neutrophiliques ont plusieurs effets sur leur environnement. Par exemple, ils aident à l'agrégation des bactéries, qu'elles soient opsonisées ou non. Cela diminue la dissémination des bactéries et limite l'infection (Lacy, 2013). Les ectosomes neutrophiliques modifient par ailleurs le phénotype des macrophages vers un profil prorésolution. Cela s'explique probablement en partie par la présence des phosphatidylsérines à leur surface, tout comme dans le cas des corps apoptotiques (Rhys et *al.* 2018). Un autre rôle des ectosomes neutrophiliques est la protection du cartilage en conditions pro-inflammatoires. En effet, Headland et *al.* ont montré que, chez la souris, les ectosomes (MVs) se trouvant dans le fluide synovial protègent le cartilage des dommages causés par l'inflammation. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que les ectosomes neutrophiliques stimulent la production de matrice extracellulaire par les chondrocytes, ce qui protège le cartilage (Headland et *al.*, 2015).

Les effets des vésicules extracellulaires ne sont pas que bénéfiques. Dans la littérature, il y a plusieurs exemples de vésicules extracellulaires impliquées dans des contextes physiopathologiques. Par exemple, chez la souris développant l'asthme, les cellules épithéliales pulmonaires produisent des exosomes qui stimulent la différenciation et l'activation des macrophages dans les poumons. Cela favorise le développement et la progression de l'asthme (Balhara et *al.*, 2012; Kulshreshtha et *al.*, 2013). Une autre étude a montré que les exosomes produits par les cellules du mélanome B-16 sont transportés dans les ganglions lymphatiques où ils interagissent avec leur cellule cible et activent certains gènes clés à l'établissement de la niche métastatique. Cela promeut l'établissement de métastases dans les ganglions lymphatiques (Hood et *al.*, 2011). Enfin, Dujardin et *al.* ont démontré que les neurones malades des patients atteints d'Alzheimer produisent des ectosomes, lesquels transportent des protéines Tau vers les neurones sains. L'accumulation de protéine Tau dans les neurones sains fait progresser l'Alzheimer (Dujardin et *al.*, 2014).

Comme discuté dans les paragraphes précédents, les vésicules extracellulaires ont des rôles variés. Ces rôles peuvent être pathologiques ou non. À ce jour, les effets identifiés chez les ectosomes neutrophiliques semblent être non-pathologiques et bénéfiques pour la

résolution de l'inflammation. Les ectosomes neutrophiliques sont des vésicules extracellulaires qui semblent importants dans la mise en place et la régulation de la réponse immunitaire. Ils pourraient jouer un rôle important dans certaines pathologies en inhibant les fonctions pro-inflammatoires de certaines cellules immunitaires comme le macrophage. C'est pourquoi son étude est primordiale pour approfondir notre compréhension du fonctionnement du neutrophile et ses effets sur le système immunitaire humain.

7. Hypothèse et objectifs de recherche

Les ectosomes neutrophiliques ont des effets anti-inflammatoires/pro-résolution chez plusieurs cellules immunitaires comme les cellules NK et les macrophages (Nauseef et *al.* 2014). Donc, il serait étonnant que les ectosomes neutrophiliques n'aient aucun effet sur les neutrophiles eux-mêmes.

Dans ce mémoire, l'hypothèse de recherche soutenue est que les ectosomes neutrophiliques humains ont des effets sur certaines réponses fonctionnelles des neutrophiles humains comme la survie, la NETose et la production de cytokines.

Objectifs

1. Isoler et identifier les ectosomes neutrophiliques.
2. Mettre au point une méthode robuste pour effectuer un compte semi-quantitatif des ectosomes neutrophiliques.
3. Caractériser la cinétique de production des ectosomes par le neutrophile humain pour différents stimuli physiologiques.

Évaluer les effets des ectosomes neutrophiliques sur les réponses fonctionnelles du neutrophile (la survie du neutrophile, la NETose et la production de chimiokines).

8. Matériels et méthodes

8.1. Réactifs et produits utilisés

8.1.1. Réactifs fluorescents

L'annexine-V-FITC, l'annexine-V-APC, anti-CD66b-PE proviennent de BioLegend (San Diego, CA, USA). La calcéine-AM bleue a été achetée chez InVitrogen (Waltham, MA, USA). Le cytotrack Red 628/643 a été commandé chez Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Le CFSE, Hoeschst 33342, la phalloïdine 488 proviennent tous de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Anti-PDL1-FITC provient de chez Pharmingen (San Jose, CA, USA). Les réactifs PlaNET proviennent de Sunshine Antibodies (Sherbrooke, Qc, Canada).

8.1.2. Inhibiteurs de voies de signalisation

PP1, PP2, Piceatannol proviennent de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Le SB203580, U0126, LY294002, et le 5z-7oxozeanol sont de Calbiochem (San Diego, CA, USA). Les paires d'anticorps pour les ELISA sandwich, ainsi que les cytokines et facteurs de croissance (TNF- α , GM-CSF) sont de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Le LPS UltraPure (E. coli 0111 :B4) a été acheté chez InvivoGen (San Diego, CA, USA). Le fMLP, le DMSO, l'iodure de propidium et le PMSF sont de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Le RPMI 1640 (sans endotoxine) et le LSM (sans endotoxine) ont été acheté chez Wisent (St-Bruno, Qc, Canada). Toutes les autres solutions et tampons sont préparés avec de l'eau clinique sans pyrogènes (Baxter).

8.2. Isolement et culture cellulaire

Les neutrophiles ont été isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains selon un protocole approuvé (#2001-18, 01-16) par un comité d'éthique institutionnel (Comité d'éthique de la recherche du CIUSS de l'Estrie-CHUS). En accord avec la Déclaration de Helsinki, tous les donneurs ont donné leur consentement écrit de façon libre et éclairée. La

procédure d'isolement se fait à température ambiante. Le sang est recueilli avec une poche de prélèvement contenant un anticoagulant (citrate de sodium). Le sang est ensuite centrifugé (260g, 15min, T.P.). Le plasma riche en plaquettes est enlevé, remplacé par du PBS stérile et du Dextran T500 est ajouté (3% final, v/v). Suite à une incubation de 30 min pendant laquelle une sédimentation a lieu, le surnageant est déposé sur un coussin de *Lymphocyte separation medium* (LSM) et centrifugé (400g, 20 min., T.P.). Ceci permet de récupérer les PBMCs (un anneau à l'interface du LSM) et les granulocytes dans le culot. Le culot est ensuite soumis à une lyse hypotonique de 20 secondes dans l'eau de façon à se débarrasser des érythrocytes résiduels. Les neutrophiles sont ensuite lavés avec du PBS avant d'être resuspendus dans du RPMI 1640 supplémenté avec du sérum autologue (5%). La concentration de neutrophile dans le RPMI 1640 est de 5×10^6 cellules par ml. Comme le démontre la coloration de Wright/Giemsa, la concentration en monocytes et lymphocytes dans la suspension finale est de moins de 0,1%. La viabilité des neutrophiles est de plus de 98% après 4 heures en culture, tel que déterminé par une exclusion au bleu de trypan et par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'annexine V et à l'iodure de propidium.



Figure 10. Marquage Wright/Giemsa des neutrophiles et des éosinophiles.

Image représentative de la coloration Wright/Giemsa. Sur cette image, il y a quelques éosinophiles identifiables à leur coloration plus foncées et les autres cellules sont des neutrophiles. Il n'y a pas de monocytes ou de lymphocytes présents

8.3. Production et isolement des ectosomes par stimulation *in vivo*

Les neutrophiles isolés sont mis dans une plaque de 12 puits (1 ml de suspension par puits). Ils sont ensuite incubés à 37°C et 5% de CO₂ pendant 2 heures (ou autrement, si spécifié) avec ou sans stimuli et/ou inhibiteurs. La culture est récupérée et centrifugée à

1000g pendant 15 minutes. Le surnageant est récolté et centrifugé une seconde fois à 4°C pendant 15 minutes à 4000g pour récolter un culot d'ectosomes purifiés, ou à 15 000g et plus pour obtenir un surnageant sans ectosomes. Finalement, le culot obtenu à 4000g est resuspendu dans 100 µl de PBS par ml de suspension de neutrophiles de départ.

8.4. Production et isolement des ectosomes par cavitation à l'azote

Les neutrophiles à 5×10^6 ou 50×10^6 cellules par ml dans du RPMI 1640 ou du PBS, selon l'expérience, sont placés sur glace dans une bombe à azote en métal hermétique. La pression est ensuite augmentée à 350 psi à l'aide d'azote sous pression (Ear et al 2005). Les neutrophiles sont maintenus dans cet environnement pendant 10 minutes avant d'être récupérés dans un tube conique de 50 ml. Le cavitat recueilli est centrifugé (1000 g, 4°C) pendant 15 minutes afin de précipiter les gros débris et les corps apoptotiques. Le surnageant est récolté et centrifugé à 4000 g pendant 15 minutes afin de précipiter les ectosomes. Le culot est resuspendu dans 100 µl de PBS par ml de suspension de neutrophiles de départ.

8.5. Cytométrie en flux

8.5.1. Marquage des ectosomes, identification et compte des ectosomes

À 10 µl de la suspension d'ectosomes purifiés sont ajoutés 40 µl de PBS stérile contenant de la calcéine-AM bleue à une concentration finale de 6 µM. Les ectosomes sont ensuite incubés à température ambiante pendant 20 minutes. Ensuite, les ectosomes sont incubés sur glace pendant 20 minutes dans 50 µl d'ABB (*annexin-binding buffer*) contenant 3 µl d'annexine V-Alexa647 et 3 µl d'anti-CD66b-PE. Après l'incubation, 100 µl de PBS froid sont ajoutés et les échantillons sont conservés sur glace jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux. Les échantillons sont analysés dans un Cytotflex S (Beckman Coulter) avec le logiciel CytExpert. La première étape de l'identification consiste à délimiter la zone contenant les ectosomes et à ajuster les limites de détection de la taille (FSC) et de la granulosité (SSC). Cette étape se fait à l'aide de billes de calibration de 100 nm et de 500 nm, ainsi qu'avec des neutrophiles frais. Les échantillons d'ectosomes marqués à l'annexine V-Alexa647, à l'anti-CD66b-PE et à la calcéine-AM bleue sont analysés au cytomètre à un débit de 60 µl par minutes. Les filtres nommés APC (Alexa647), PE et DAPI (calcéine bleue) sont utilisés pour

visualiser l'émission des trois marqueurs utilisés. Seuls les événements contenus dans la zone de délimitation et positifs au triple marquage sont comptés (à moins d'indications contraires). Les événements obtenus lorsque le flux d'échantillon est instable sont ignorés.

8.5.2. Spécificité du marquage à la calcéine-AM

Des échantillons contenant 5×10^6 cellules par ml de RPMI1640 et leurs ectosomes sont incubés à T.P. pendant 20 minutes avec la calcéine-AM bleue à une concentration finale de 6 μ M. Puis, certains échantillons ont été incubés pendant 5 minutes avec de la saponine 0,1% pour solubiliser la membrane des cellules et des ectosomes. Finalement, tous les échantillons sont incubés avec du chlorure de cobalt (II) à une concentration finale de 100 μ M. Le chlorure de cobalt (II) élimine le signal de la calcéine présente à l'extérieure des cellules et des vésicules. Les échantillons ont été analysés par cytométrie en flux (Zhai et al., 2007).

8.5.3. Interaction ectosomes/cellules

Les ectosomes purifiés et comptés sont incubés à température pièce avec du Cytotrack Red 628/643 pendant 20 minutes. Ils sont ensuite centrifugés à 15 000 g pendant 15 minutes et rincés avec du PBS. Cette étape est répétée 3 fois. Finalement, les ectosomes sont resuspendus à une concentration de 25 millions par 50 μ l et incubés à 37°C avec les cellules à un ratio de 5 ectosomes par cellule. L'incubation est d'une durée variant de 5 minutes à 4 heures. Les cellules sont récoltées par centrifugation (400g, 10 minutes, 4°C) et analysées au cytomètre (CytoFlex S) à l'aide du filtre APC, du FSC et du SSC; 10 000 cellules par échantillon sont acquises.

8.5.4. Marquage de l'actine

Les ectosomes purifiés sont fixés dans du PBS stérile contenant 2% de PFA pendant 15 minutes à température ambiante. Par la suite, ils sont incubés avec une solution de saponine à une concentration finale de 0,1% pendant 5 minutes. Ils sont récoltés par une centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes avant d'être resuspendus à une concentration de

5 millions par 50 μ l dans du PBS stérile et froid. Puis, ils sont incubés avec de la phalloïdine 488 à une concentration de 165 nM pendant 30 minutes dans le noir. Les ectosomes sont ensuite analysés par cytométrie en flux (CytoFlex S) à l'aide du filtre FITC.

8.5.5. Effet de l'ajout d'ectosomes sur l'apoptose

Les neutrophiles (5×10^6) sont incubés à 37°C pendant 20 heures avec ou sans stimulus et/ou ectosomes. À moins d'une indication contraire, nous utilisons un ratio de cinq ectosomes pour un neutrophile. Les cellules sont recueillies et rincées avec du PBS froid. Elles sont ensuite incubées sur glace pendant 30 minutes dans 100 μ l d'ABB contenant 2 μ l d'Annexine-V-FITC. Puis, de l'iodure de propidium à une concentration finale de 1 μ g/ml est ajouté juste avant l'analyse par cytométrie en flux. L'analyse se fait via les filtres APC et FITC. 10 000 cellules par échantillon sont acquises.

8.6. Visualisation de la NETose

Dans une plaque de 24 puits, 500 μ l d'une suspension de neutrophiles à 2×10^6 cellules par ml sont déposés sur des lamelles de microscopie recouvertes de poly-L-lysine. Les cellules sont incubées pendant 1 h à 37°C. Par la suite, les cellules sont incubées avec ou sans stimulus et/ou ectosomes pendant 4 h à 37°C à 5% de CO₂. La réaction est arrêtée en ajoutant 500 μ l de PBS froid contenant 1 mM de PMSF. La plaque est placée sur glace pendant 10 minutes. Ensuite, les neutrophiles sont incubés sur glace pendant 90 minutes avec 1 ml de PBS contenant 1 mM de PMSF et 0,3 μ l de la solution commerciale de *Planet reagent* pour marquer les NETs. Puis, les cellules sont fixées avec du PBS contenant 2% de PFA et 1 μ l de la solution commerciale de Hoechst 33342, un marqueur nucléaire, pendant 15 minutes à température ambiante. Finalement, les cellules sont lavées une fois avec du PBS et analysées par microscopie à épifluorescence. La quantification se fait à l'aide de 3 champs à un grossissement de 10x.

8.7. Quantification des chimiokines secrétées

Une suspension de 600 μl de neutrophiles (3×10^6 cellules) est déposée dans des plaques de 12 puits puis incubée avec ou sans stimulus et/ou ectosomes. Le temps d'incubation varie en fonction de la cytokine à observer. Après l'incubation, les cellules sont culottées (10 000g, 5min, 4°C) et les surnageants sont ensuite congelés dans de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La concentration des différentes cytokines dans le milieu est déterminée à l'aide de tests ELISA commercialement disponibles.

8.8. Confirmation de la présence d'ectosomes dans les échantillons (TEM)

Les ectosomes sont produits soit par la cavitation à l'azote, par des cellules non-stimulées ou par des cellules stimulées par 100 U/ml $\text{TNF}\alpha$ ou par 100 nM fMLP. Ils sont ensuite recueillis par centrifugation (4000g, 15 min., 4°C) avant d'être lavés trois fois avec du PBS stérile. Ils sont ensuite fixés dans 250 μl de PBS contenant 2% de PFA. Les ectosomes fixés sont transférés sur des grilles de carbone-Formvar (température ambiante, 1 h). Il y a ensuite une post-fixation utilisant du glutaraldéhyde 2,5% (10 minutes) et trois lavages à l'eau de 2 minutes. Puis, les grilles sont incubées pendant 15 minutes sur une solution d'uranyle acétate 2%. Finalement, les grilles sont incubées avec une solution contenant 0,8% d'uranyle acétate et 0,13% de méthyle-cellulose avant d'être rincées avec de l'eau et analysées par TEM.

8.9. Analyses statistiques

Les résultats sont représentés par la moyenne \pm SEM. L'analyse statistique des résultats est faite à l'aide du logiciel Prism 7 (GraphPad, San Diego, CA, USA) et utilise le Test *t* de Student pour des données pairés avec $p \leq 0,05$.

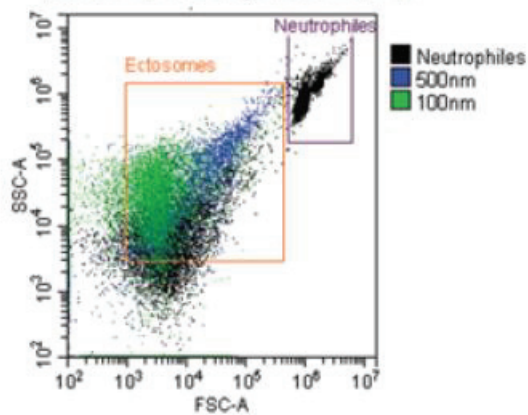
9. Résultats

9.1. L'identification des ectosomes neutrophiliques

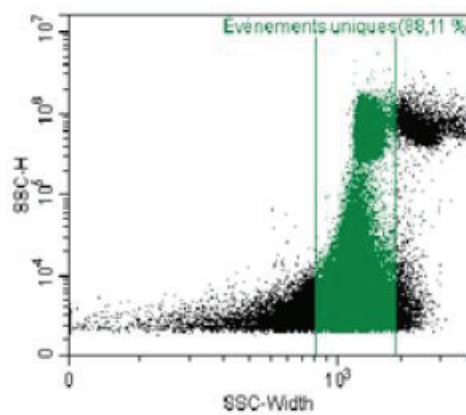
Comme démontré dans la littérature scientifique, les neutrophiles humains produisent plusieurs types de vésicules extracellulaires, dont les ectosomes. La caractérisation de ces microvésicules neutrophiliques en est à ses débuts. Les ectosomes de différentes cellules partagent des caractéristiques communes. Par exemple, elles mesurent entre 100 et 1000 nm, la double membrane est conservée, les phosphatidylsérines (PS) sont exposées à la surface externe, et ils contiennent plusieurs enzymes comme des estérases (Sadallah et *al.*, 2011; Cocucci et *al.*, 2015; Meldolesi et *al.*, 2018). La présence d'estérases permet l'utilisation d'un marqueur comme la calcéine-AM puisque ceux-ci hydrolisent l'AM ce qui rend la calcéine fluorescente et hydrophile. Les PS exposées servent aussi de marqueurs d'ectosomes puisqu'ils lient l'annexine-V. Il y a une ségrégation des récepteurs de surface sur la membrane des ectosomes. Chez le neutrophile, on y retrouve, entre autres, CD66b (Gasser et *al.*, 2004), lequel peut être utilisé comme marqueur spécifique des ectosomes d'origine neutrophilique.

Les figures 11A à D montrent les paramètres et les analyses par cytométrie en flux qui nous permettent de cibler une zone contenant les ectosomes. Tout d'abord, la zone est délimitée à l'aide d'outils d'approximation de la taille et de la granulosité (FSC et SSC, respectivement). En combinant ces indices avec des billes de calibration de 100 nm et de 500 nm, il est possible d'identifier une zone propice à contenir les ectosomes (figure 11A). La figure 11B montre qu'une zone d'exclusion des cellules et des gros débris est mise en place. La figure 11C montre la méthode utilisée pour inclure les événements uniques dans l'analyse et exclure les agrégats. La figure 11D montre une population d'ectosomes neutrophiliques positive au triple marquage (Calcéine-AM, Annexine-V et anti-CD66b). La figure 11E montre la spécificité de la calcéine-AM pour les vésicules intactes. Finalement, à l'aide de ces paramètres et de ces marqueurs, il est possible de visualiser les différentes populations d'ectosomes neutrophiliques, qu'elles proviennent d'échantillons non stimulés, stimulés ou produit par cavitation à l'azote (11F).

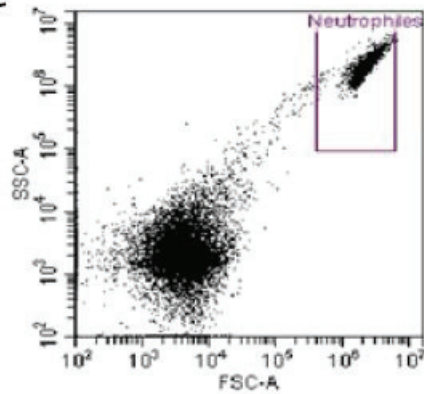
A Approximation de la taille (billes, FSC) et de la granulosité (SSC)



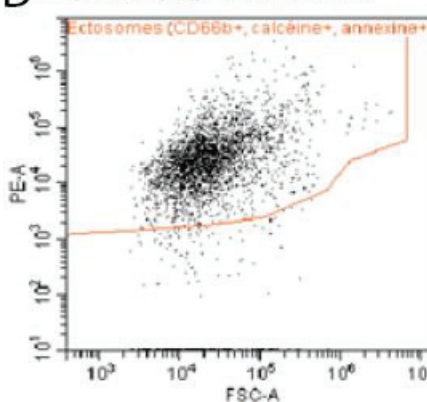
B Événements uniques



C Neutrophiles

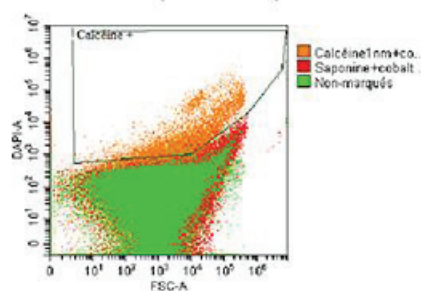


D Triple marquage des ectosomes

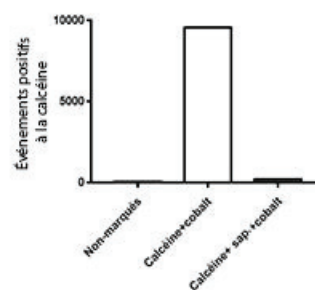


E

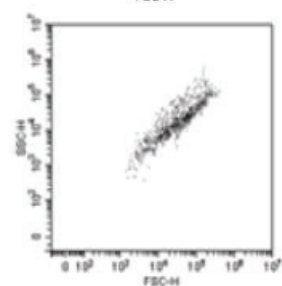
Événements positifs à la calcéine-AM (filtre DAPI-A)



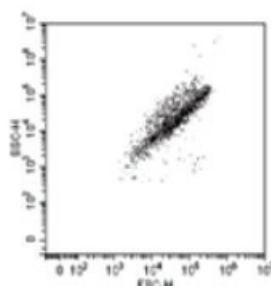
Spécificité de la calcéine-AM pour le marquage des vésicules intactes



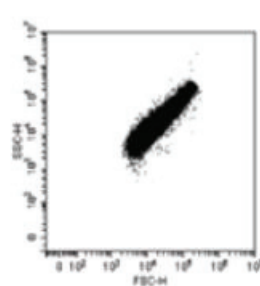
F



Ectosomes provenant de neutrophiles non-stimulés



Ectosomes provenant de neutrophiles stimulés au fMLP



Ectosomes produits par cavitation à l'azote

Figure 11. Identification des ectosomes neutrophiliques par cytométrie en flux.

Images représentatives d'une expérience. A. La zone orange délimitée à l'aide des billes de 100 nm (vert) et 1000 nm (bleu) contient les ectosomes neutrophiliques. L'échantillon de neutrophiles est en noir. B. La zone d'exclusion des cellules et des plus gros événements. Les cellules sont en verts et la partie contenant les microvésicules en noirs. C. La zone permettant d'identifier les événements simples et d'exclure les agrégats. D. La population obtenue à l'aide du triple marquage à la calcéine-AM bleue (6 μ M), l'annexine-Alexa647 (3 μ l/200 μ l) et l'anti-CD66b-PE (3 μ l/200 μ l). E. Les microvésicules positives à la calcéine-AM (μ M) avec ou sans perméabilisation de la membrane. F. Les populations d'ectosomes neutrophiliques visibles pour un échantillon non stimulé, un échantillon stimulé au fMLP (100 nM) et un échantillon provenant de la cavitation à l'azote de cellules non stimulées.

Une confirmation de la présence d'ectosomes dans nos échantillons a été obtenue à l'aide de la microscopie électronique par transmission (TEM) comme le montre la figure 12. La première photo montre un échantillon stimulé au fMLP et la deuxième un échantillon obtenu par cavitation à l'azote. Il est important de noter que comme les résultats obtenus en cytométrie, il semble y avoir plus d'ectosomes dans les échantillons produits par cavitation à l'azote, mais aucune quantification n'a été faite. Ceci étant, les ectosomes sont bel et bien de la taille attendue.

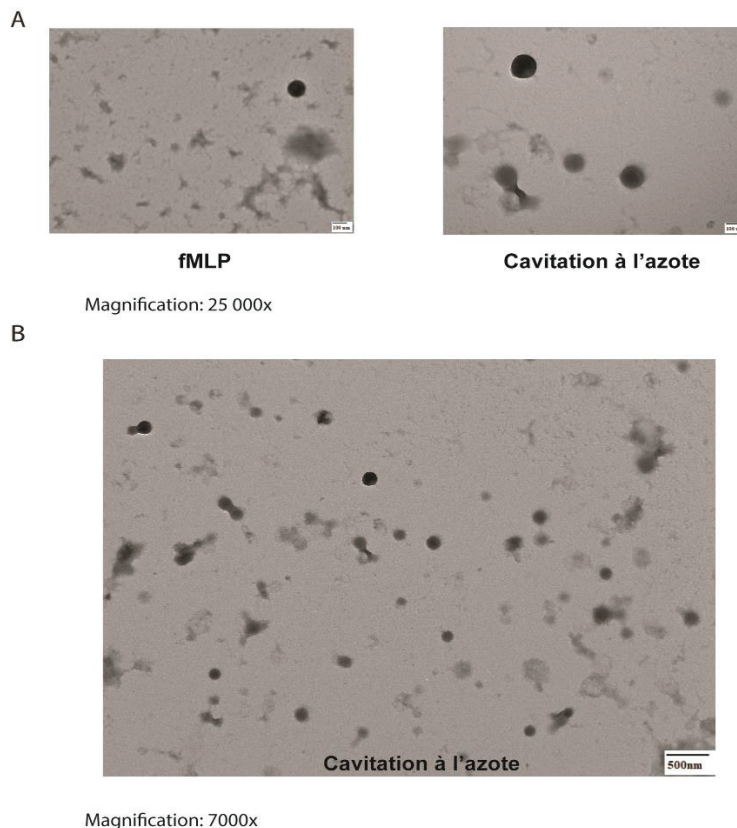


Figure 12. Confirmation de la présence de microvésicules par TEM

Images représentatives d'une expérience. A. La première image montre une microvésicule provenant d'un échantillon stimulé au fMLP (100 nM, 2 h). La seconde image montre des ectosomes obtenus par cavitation à l'azote (350 psi, 10 min). B. L'image montre un champ à 7000x contenant des microvésicules obtenues par cavitation à l'azote. n=2

9.2. Isolement et la conservation des ectosomes neutrophiliques

L'identification des ectosomes est une étape clef de ce projet, mais cela ne permet pas d'utiliser les ectosomes pour stimuler les neutrophiles. Pour pouvoir utiliser les ectosomes, il a été nécessaire de développer une méthode d'isolement des ectosomes neutrophiliques. La méthode privilégiée pour l'isolement des ectosomes est la centrifugation différentielle. On se débarrasse en premier des gros débris et noyaux par une centrifugation à 1000g pendant 10 min. À partir du surnageant ainsi obtenu, une première centrifugation à 4000g permet de culotter de 76 à 84% des ectosomes neutrophiliques triple marqués dans l'échantillon. À la suite de cette première centrifugation, le surnageant est centrifugé à 15 000g, et 12 à 21% d'ectosomes supplémentaires sont culottés. Le surnageant de la seconde centrifugation est finalement ultracentrifugé à 100 000g pendant une heure. Cette dernière centrifugation permet de culotter un 2 à 12% d'ectosomes supplémentaires (Figure 13A).

Par ailleurs, il faut pouvoir conserver les ectosomes produits pour les utiliser dans des expériences subséquentes. Trois protocoles de conservation ont été testés (Figure 13B). Le premier protocole consiste à culotter les ectosomes et les conserver à 4°C. Le second protocole consiste à faire un *snap freeze* (-196°C) des culots d'ectosomes et à les entreposer à -80°C. Le dernier protocole est celui utilisé pour congeler les lignées cellulaires, dans lequel 10% de DMSO est ajouté à l'échantillon et celui-ci est mis à -80°C dans un compartiment permettant à la température de descendre lentement jusqu'à l'atteinte du -80°C. Comme le montre la figure 13B, il n'y a pas de différences significatives entre la quantité d'ectosomes conservés par chacune des méthodes. Cependant, avec la première méthode (culots conservés à 4°C), la quantité d'ectosomes conservés varie énormément d'un échantillon à l'autre. Il y a aussi des formations d'agrégats dès le premier jour (figure 13C). La seconde méthode (*snap freeze*) permet de conserver les ectosomes sans que des agrégats

ne se forment en grande quantité. Cependant, la quantité d'ectosomes conservée varie grandement d'un échantillon à l'autre. Le dernier protocole permet d'éviter la formation d'agrégats, et la variation entre les échantillons est plus faible qu'avec les deux autres méthodes. Dans cette expérience, deux méthodes sont utilisées pour éliminer les agrégats de l'analyse. Premièrement, il y a l'utilisation du paramètre SSC-Width/SSC qui permet d'éliminer certains agrégats de l'analyse. Deuxièmement, l'utilisation de contours permet de cibler des événements anormaux. Dans ce cas-ci, les contours en vert dans les graphiques de la figure 13C permettent d'éliminer de l'analyse les événements dont la taille est plus grande que celle des ectosomes. Ces événements représentent probablement des agrégats puisque les échantillons ne contiennent pas de cellules.

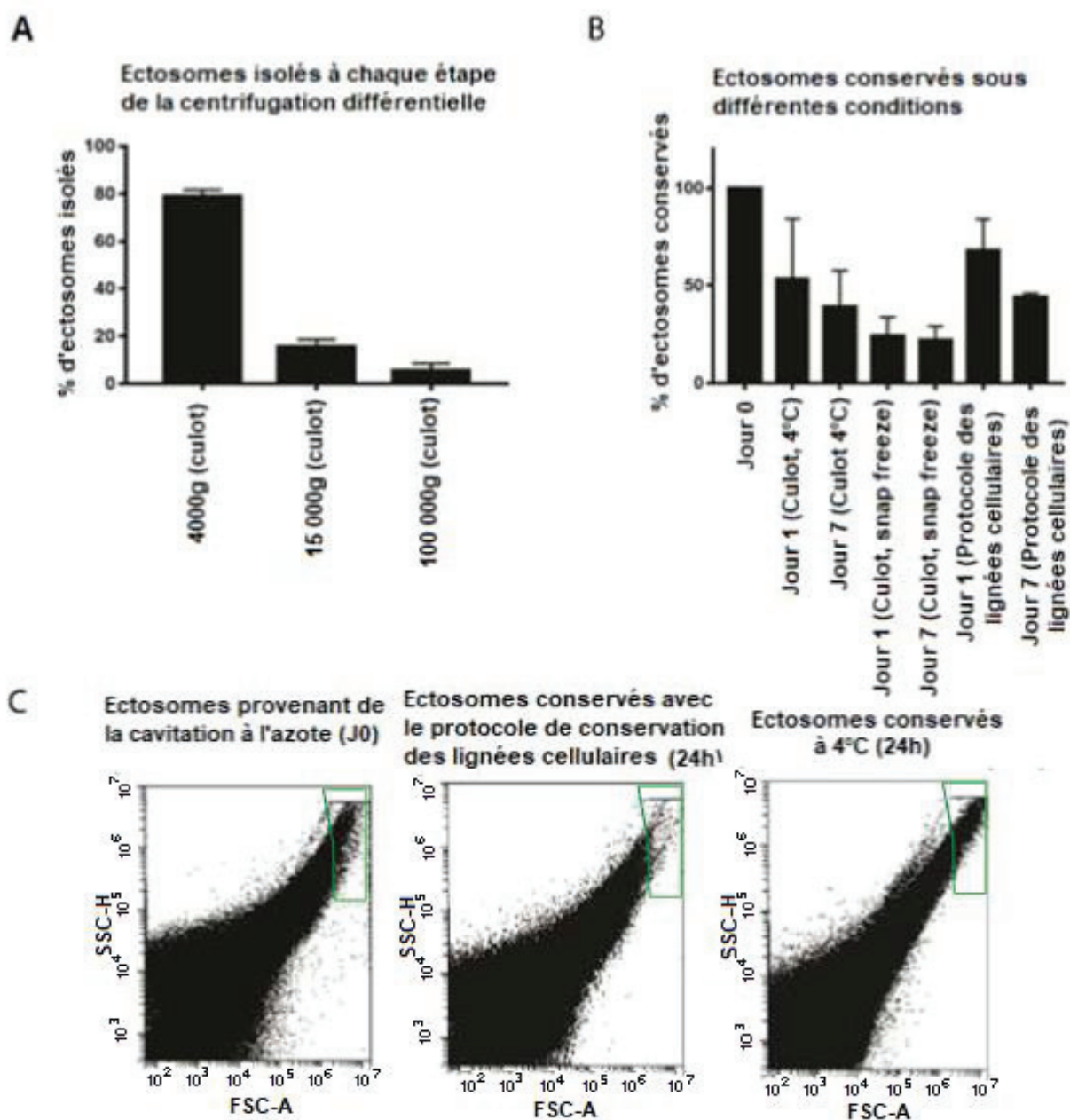


Figure 13. Isolement et la conservation des ectosomes neutrophiliques

A. Proportion d'ectosomes isolés à chaque étape de la centrifugation différentielle. Les ectosomes sont identifiés à l'aide du triple marquage à la calcéine-AM bleue (6 μ M), l'annexine-alexa647 (3 μ l/200 μ l) et l'anti-CD66b-PE (3 μ l/200 μ l). Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. B. Graphique montrant le % d'ectosomes conservés pour chacune des méthodes testées après 24 h ou 7 jours. Les ectosomes sont identifiés à l'aide du triple marquage. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes. C. Images

représentatives d'une expérience de conservation démontrant la présence importante d'agrégats (encadré vert) lors de la conservation des culots d'ectosomes à 4°C.

9.3. Cinétique de production des ectosomes neutrophiliques

Suite à la mise en place d'une méthode fiable pour l'isolement et l'identification des ectosomes neutrophiliques, nous nous sommes intéressés à leur cinétique de production dans le but d'optimiser la quantité d'ectosomes produits et récoltés. Le neutrophile produit constitutivement des ectosomes, mais certains stimuli permettent d'augmenter la quantité de microvésicules produites (Timár et *al.*, 2013; Hong, 2018). Nous avons donc étudié la cinétique de production des ectosomes neutrophiliques en réponse à 4 stimuli différents : le GM-CSF, le LPS, le TNF α et le fMLP. Dans la littérature, il est connu que le LPS, le TNF α et le fMLP stimulent la production d'ectosomes par le neutrophile (Hong, 2018). Cependant, l'effet du GM-CSF sur la production d'ectosomes n'est pas connu. Dans la figure 14A, il est montré que le LPS, le fMLP et le TNF- α stimulent la production d'ectosomes neutrophiliques. Par contre, le GM-CSF ne stimule pas de façon significative la production d'ectosomes par les neutrophiles (fig. 14A). Ainsi, tous les stimuli du neutrophile n'induisent pas la génération d'ectosomes. Il est important de noter que la production d'ectosomes par les neutrophiles en réponse au LPS varie grandement en fonction des différents donneurs, ce qui n'est pas le cas avec le TNF- α et le fMLP. Pour cette raison, les expériences subséquentes ont été réalisées avec du fMLP et/ou du TNF- α .

Dans la littérature, il est décrit que certaines cellules comme les macrophages et les cellules dendritiques produisent des ectosomes dans les secondes suivant leur stimulation (Coccuci et *al.*, 2009; Shifrin et *al.*, 2013; Baroni et *al.*, 2007). Chez le neutrophile, la production serait également rapide, débutant quelques minutes après la stimulation et continuant pendant quelques heures (Johnson III et *al.*, 2014; Cumpelik et *al.* 2015). Dans le but d'investiguer les conditions optimales de production d'ectosomes par les neutrophiles, nous avons réalisé des cinétiques de production d'ectosomes par les neutrophiles stimulés par du TNF- α ou du fMLP (figure 14B). Les deux stimuli induisent rapidement la production d'ectosomes neutrophiliques (< 15 minutes). La production reste stable pendant quelques heures et tend à diminuer légèrement après 4 heures (figure 14B).

Suite à la faible quantité d'ectosomes obtenus par la stimulation physiologique, nous avons tenté une méthode permettant de produire rapidement de grandes quantités d'ectosomes. Gao et *al.* (2017) ont rapporté un protocole permettant la production d'ectosome par cavitation à l'azote. Cependant, contrairement à leur protocole, la cavitation à l'azote est faite une seule fois à 350 psi pendant 10 minutes plutôt que deux fois à 450 psi pendant 15 minutes. Cela permet d'éviter la lyse nucléaire et de diminuer la quantité de débris produits (Ear et *al.* 2005; McDonald et *al.*, 1997). Comme le démontre la figure 14C, la cavitation à l'azote permet d'obtenir rapidement une grande quantité d'ectosomes même à partir de neutrophiles non stimulés. De plus, il est possible d'augmenter la densité de neutrophiles par ml de solution pour augmenter la quantité d'ectosomes produits (Figure 14D). Le quantité d'ectosomes obtenus par cavitation à l'azote est bien supérieure à celle obtenue par la stimulation avec le fMLP. Donc, contrairement aux stimuli physiologiques, la cavitation à l'azote permet d'obtenir rapidement et simplement une quantité importante d'ectosomes neutrophiliques. Cela est nécessaire pour étudier les effets des ectosomes neutrophiliques sur les réponses du neutrophile humain.

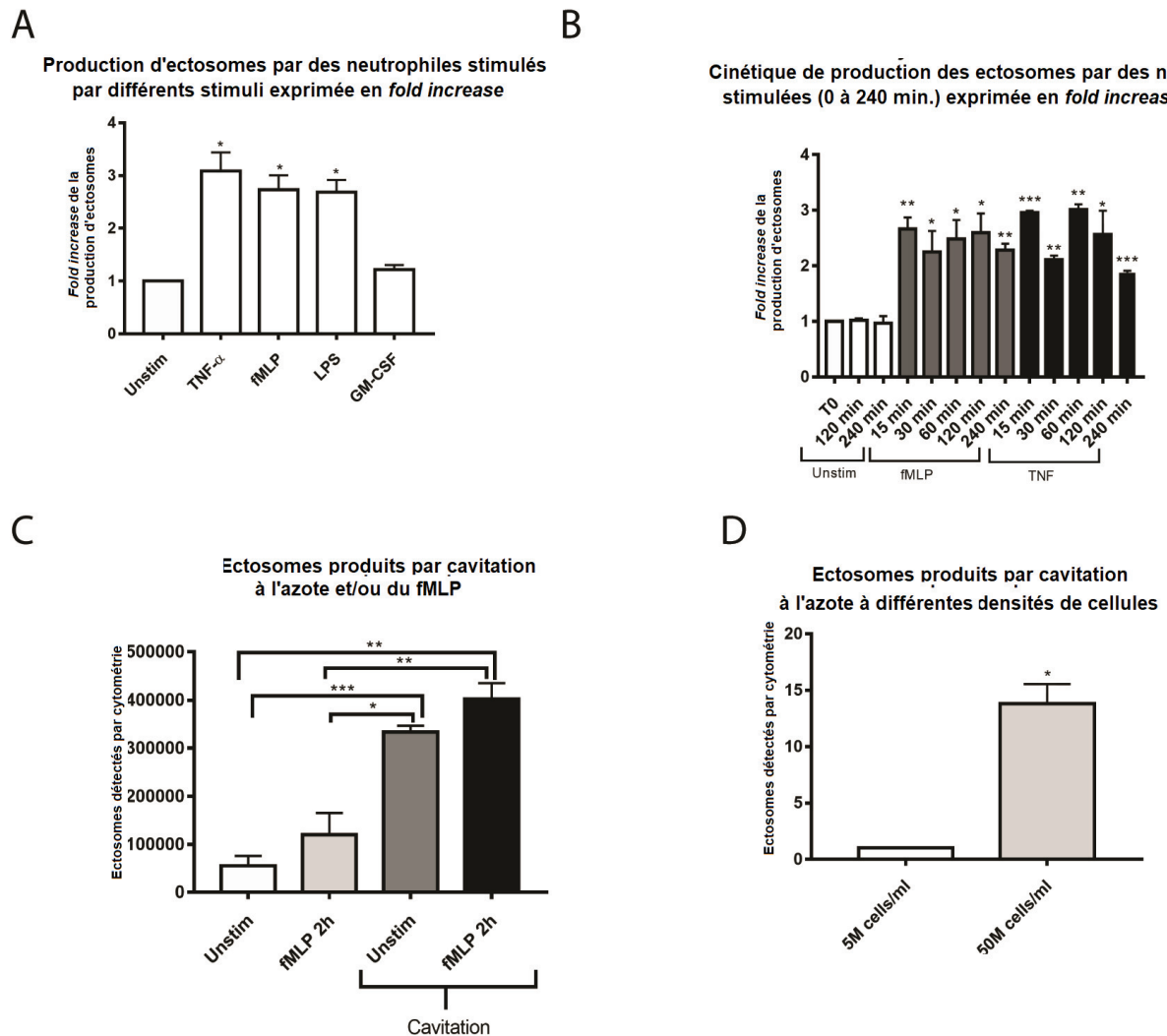


Figure 14. Cinétique de production des ectosomes neutrophiliques

A. Les cellules ont été stimulées au fMLP (100 nM), TNF- α (100 U/ml), LPS (100 ng/ml) ou GM-CSF (1 nM) pendant 2 heures. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$ vs ctrl non stimulé. **B.** Cinétique de la production d'ectosomes par des neutrophiles stimulés au fMLP (100 nM) et au TNF- α (100 U/ml). Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs ctrl non stimulé. **C.** Ectosomes produits par 5M de cellules à l'aide de la cavitation à l'azote (350 psi, 10 minutes) et/ou de la stimulation au fMLP (100 nM) pendant 2h. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs ctrl non stimulé. **D.** Ectosomes produits par cavitation à l'azote en augmentant la densité de neutrophiles (5M/ml vs 50M/ml). Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$.

9.4. Inhibition de la production d'ectosomes chez le neutrophile humain

Puisque nous avons une méthode fiable pour étudier la production d'ectosomes chez le neutrophile, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation affectant leur production. Des études précédentes dans le laboratoire ont montré l'importance des voies de signalisation MAPKs, Syk/Src, PI3K/Akt et IKK/NF- κ B dans la régulation des réponses fonctionnelles du neutrophile (Ear et al., 2010; Fortin et al., 2011; Fortin et al., 2013; Sylvain-Prévost et al., 2015; Simard et al., 2015; Tatsiy et McDonald, 2018). Nous avons bloqué les différentes voies à l'aide d'inhibiteurs sélectifs précédemment utilisés et testés dans le laboratoire. TAK1 est inhibé avec le 5Z-7-oxozeaenol (1 μ M); p38 avec SB203580 (1 μ M); MEK avec PD98059 ou UO126 (10 μ M); Syk avec le piceatannol (10 μ M); PI3K avec le LY294002 (10 μ M); Src avec PP1, PP2, ou Src-I1 (10 μ M); et JNK avec SP600125 (10 μ M) ou JNK inhibitor VIII (10 μ M) (Ear et al., 2010; Fortin et al., 2011; Fortin et al., 2013; Sylvain-Prévost et al., 2015; Simard et al., 2015; Tatsiy et McDonald, 2018). Les contrôles de cette expérience sont des échantillons de neutrophiles ne contenant pas d'inhibiteurs ni de stimuli. Leurs conditions d'incubation sont les mêmes que celles des autres échantillons. De plus, il est important de noter que le contrôle et les échantillons contiennent tous 1 μ l de DMSO puisque certains inhibiteurs sont solubilisés dans le DMSO. Comme le montre la figure 15A, tous les inhibiteurs excepté le SP600125 ont un effet statistiquement significatif sur la production d'ectosomes chez le neutrophile. Pour ce qui est de l'effet observé avec JNK inhibitor VIII, il s'agit probablement d'un effet non-spécifique puisque SP600125 n'a aucun effet significatif et que JNK n'est pas activé par le fMLP (Cloutier et al., 2003).

Nous avons aussi utilisé un inhibiteur d'exosomes (GW4869) pour vérifier que les vésicules extracellulaires isolées ne contiennent pas en partie des exosomes. GW4869 est spécifique aux exosomes puisqu'il inhibe les nSmases alors que la biogenèse des ectosomes nécessite les aSmases (Bianco et al., 2009). Comme attendu, il n'y a eu aucun changement significatif dans la quantité d'ectosomes produits par le neutrophile en présence de l'inhibiteur d'exosomes (Figure 15B). Il ne semble pas y avoir d'impact sur la taille et la granulosité des ectosomes non plus (figure 15C).

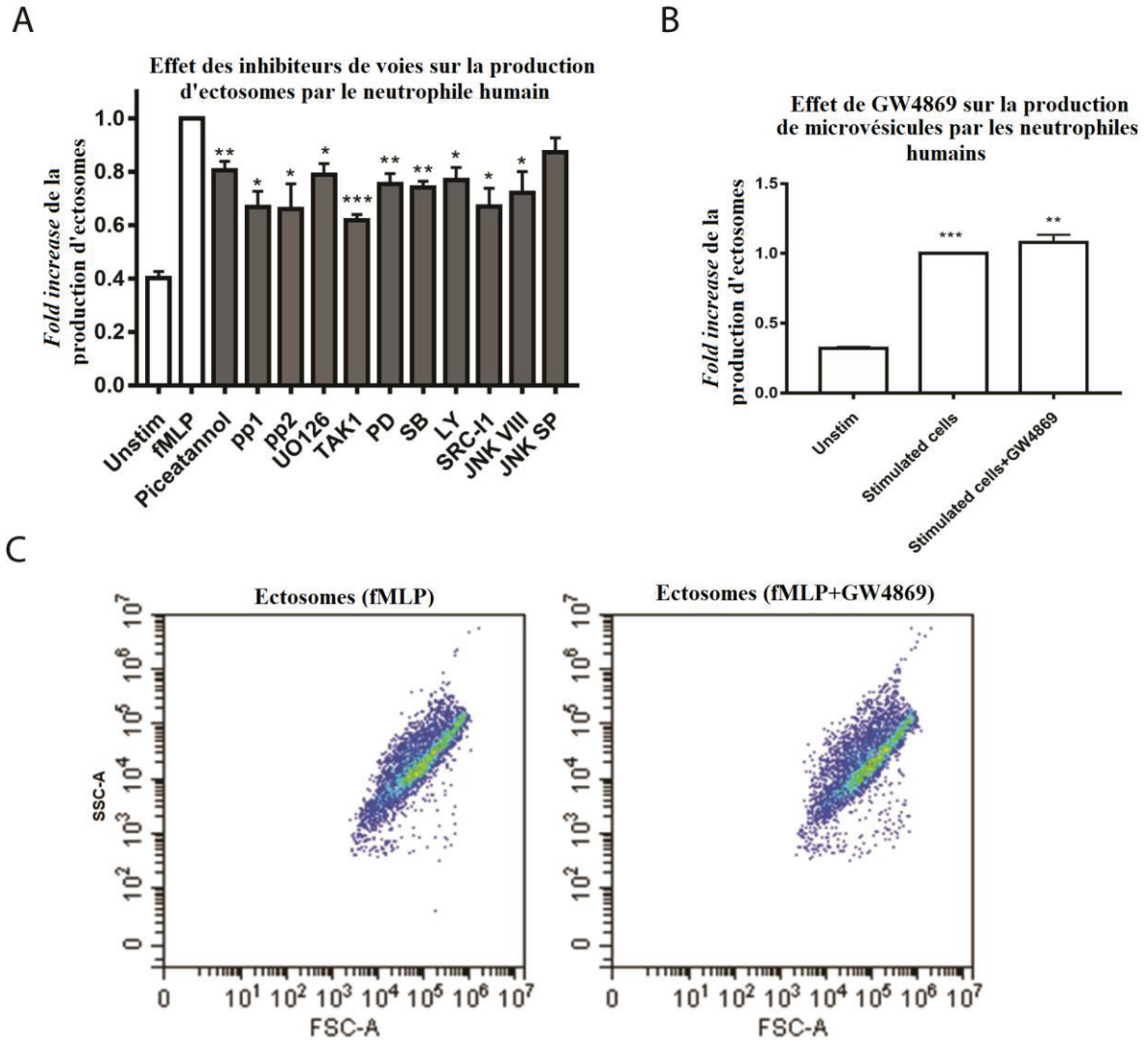


Figure 15. Effets de différents inhibiteurs sur la production d'ectosomes

A. Les neutrophiles ont été incubés avec les différents inhibiteurs pendant 30 minutes avant d'être stimulés avec du fMLP (100 nM) pendant 2h. Moyenne \pm SEM de 4 expériences indépendantes. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ et ***, $p < 0.001$ vs fMLP seul. **B.** Effet de l'inhibiteur d'exosomes sur la production de vésicules extracellulaires par le neutrophile. Les échantillons ont été incubés avec 20 μ M de GW4869 pendant 30 minutes avant d'être stimulés avec du TNF- α (100 U/ml) ou du fMLP (100 nM) pendant 2h. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs ctrl non stimulé. **C.** Population d'ectosomes observée au Cytoflex avec ou sans inhibiteur d'exosomes.

9.5. Interactions entre les ectosomes et les neutrophiles

Nous avons ensuite examiné l'impact des ectosomes neutrophiliques sur les réponses fonctionnelles de ces cellules. Pour ce faire, des ectosomes marqués au CytoTrack Red ont été co-incubés avec une population de neutrophiles à un ratio de 5 ectosomes par cellule. Les neutrophiles ont ensuite été récupérés à l'aide d'une centrifugation (400 g, 10 min, 4°C). La centrifugation à 400g permet de culotter les cellules et de conserver les ectosomes libres dans le surnageant. Les cellules culottées sont ensuite analysées par cytométrie en flux. Pour s'assurer d'observer des neutrophiles seulement, des seuils de taille et de granulosité sont mis en place à l'aide d'un échantillon de neutrophiles isolés et non-marqués. Comme on peut l'observer à la figure 16, une partie des neutrophiles devient rapidement positive au CytoTrack (< 5 minutes). Cela suggère qu'il y a une interaction entre les neutrophiles et les ectosomes, quoique le type d'interaction reste à identifier.

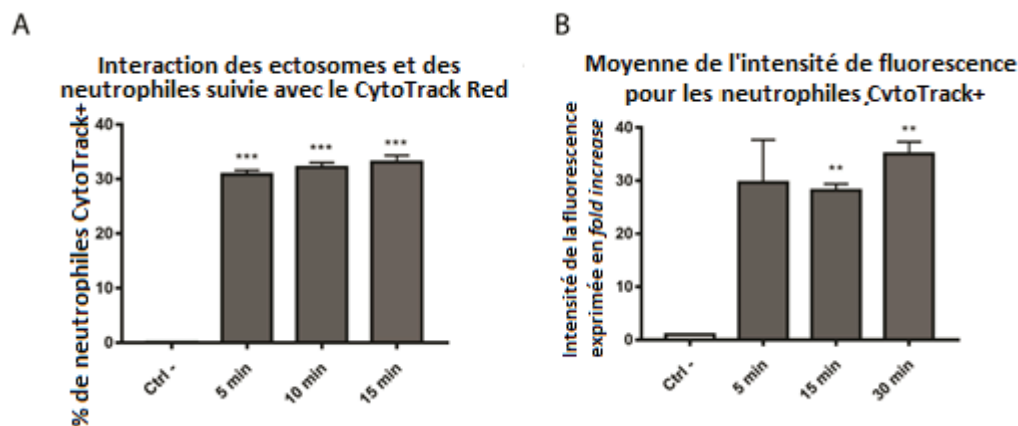


Figure 16. Interaction des ectosomes neutrophiliques et des neutrophiles

Les ectosomes ont été incubés avec du CytoTrack Red 628/643 pendant 20 minutes. Ensuite, les neutrophiles non marqués sont co-incubés avec les ectosomes CytoTrack+ avant d'être analysés par cytométrie en flux. **A.** Le % de neutrophiles positifs au CytoTrack après l'incubation avec des ectosomes neutrophiliques marqués. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ vs ctrl sans ectosome. **B.** La moyenne de fluorescence des cellules marquées au CytoTrack exprimées en fold increase du ctrl non marqué. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs ctrl sans ectosome.

9.6. Effet des ectosomes neutrophiliques sur la survie du neutrophile humain

Par la suite, nous nous sommes intéressés à leurs effets sur les réponses fonctionnelles du neutrophile. L'une des réponses étudiées est la survie du neutrophile. Pour ce faire, nous avons stimulé les neutrophiles avec du GM-CSF pour promouvoir leur survie (Fossati et *al.*, 1998). Comme nous pouvons l'observer aux figures 17A et 17B, l'ajout d'ectosomes en grande quantité diminue la survie des neutrophiles de façon significative, qu'il y est présence ou non de GM-CSF. Il est aussi intéressant de noter qu'une faible concentration d'ectosomes neutrophiliques promeut la survie des neutrophiles de façon significative (Figures 17A et 17B). Lorsqu'on analyse la nécrose des neutrophiles en présence d'ectosomes neutrophiliques, on observe la tendance inverse. Plus la quantité d'ectosomes augmente, plus la nécrose est importante. Cependant, contrairement à ce qui est observé pour la survie, une faible concentration d'ectosomes n'a pas d'effet protecteur sur la nécrose des neutrophiles (Figure 17C).

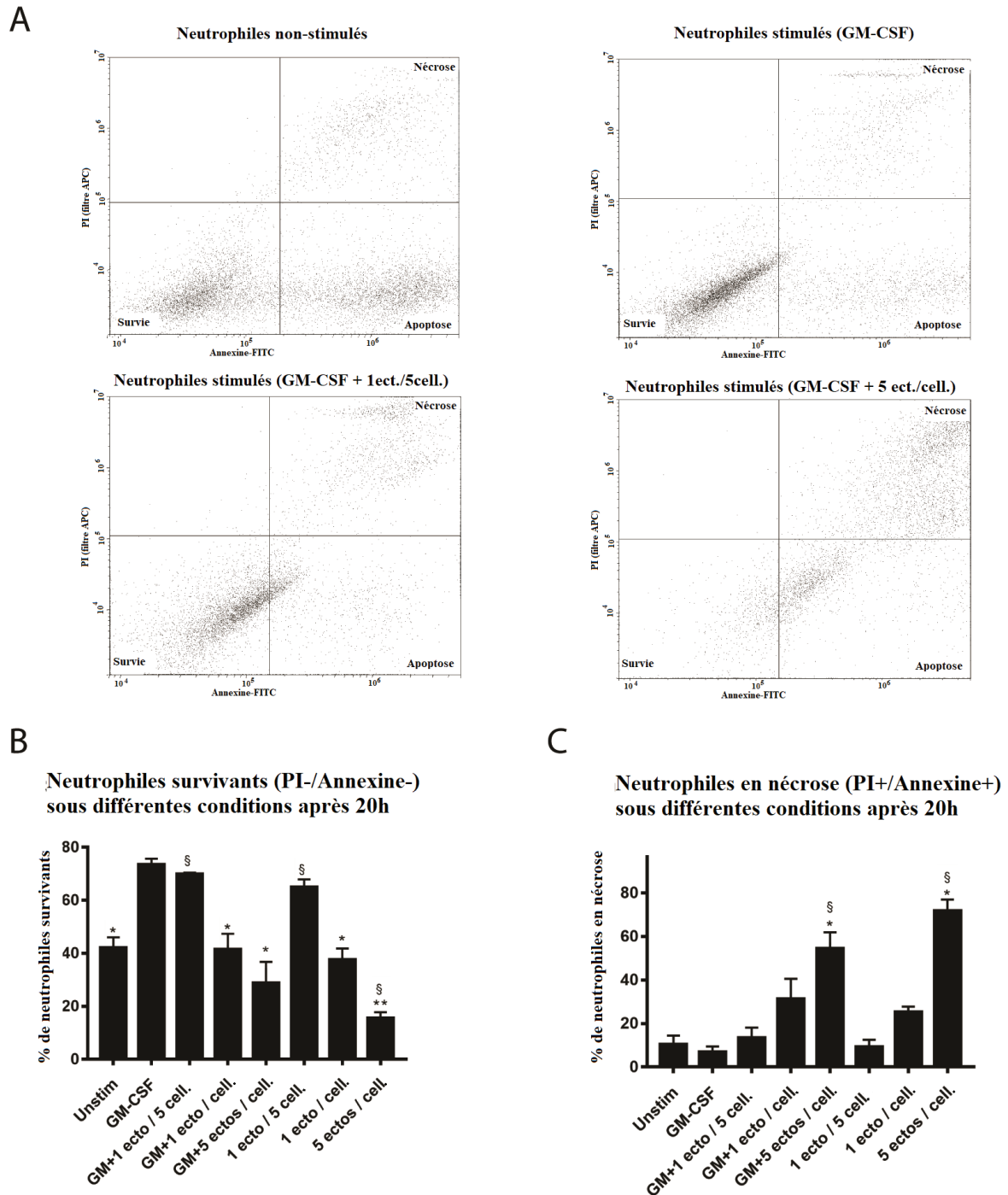


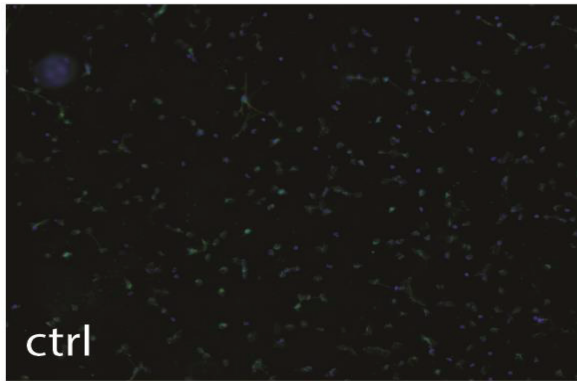
Figure 17. Effet des ectosomes neutrophiliques sur la survie du neutrophile humain

A. Images représentatives de quelques échantillons d'une expérience permettant de bien voir le déplacement de la population de neutrophile en fonction des conditions auxquelles elle est soumise. Dans la zone inférieure gauche, ce sont les neutrophiles survivants (annexine-/PI-), dans la zone inférieure droite ce sont les neutrophiles apoptotiques (annexine+/PI-) et dans le coin supérieur droit, ce sont les neutrophiles nécrotiques (annexine+/PI+). **B.** Effet

des différentes conditions sur la survie des neutrophiles après 20h avec ou sans GM-CSF (1 μ M) et/ou ectosomes. C. Effet des différentes conditions sur la nécrose des neutrophiles après 20h avec ou sans GM-CSF (1 μ M) et/ou ectosomes. §, $p < 0.05$ vs non stimulés; *, $p < 0.05$ et **, $p < 0.01$ vs GM-CSF seul. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes.

9.7. Les ectosomes neutrophiliques et la NETose

La mort du neutrophile enclenche divers mécanismes ayant des effets prorésolution et/ou anti-inflammatoires sur certaines cellules du système immunitaire, dont les macrophages (Ortega-Gomez, et *al.*, 2013; Greenlee-Wacker, 2016). Puisque les ectosomes semblent affecter les réponses anti-inflammatoires ou pro-résolution, nous avons étudié leurs effets sur une autre réponse fonctionnelle aux propriétés partiellement anti-inflammatoires: la NETose. Dans le cadre de ces expériences, les neutrophiles ont été stimulés avec des ectosomes et/ou du TNF- α , un stimulus menant à la production de NETs (Keshari et *al.*, 2012). Les résultats obtenus montrent que les ectosomes avec ou sans TNF- α stimulent la NETose des neutrophiles humains. La stimulation de la NETose par les ectosomes semble donc être dose-dépendante puisque plus le ratio d'ectosomes par cellule augmente, plus il semble y avoir de NETs. Cependant, puisqu'aucune analyse quantitative n'a encore été effectuée, cela demeure à confirmer (figure 18). Il sera donc important d'utiliser le *NETosis index* pour quantifier ces expériences. Fait à noter, les NETs observés à la plus haute concentration d'ectosomes ressemblent à ce qui est observé lors de la surstimulation de la NETose par le PMA, un agent pharmacologique (données non montrées).



Magnification: 10x

Marqueurs:
PlaNET Green
Hoechst 33342

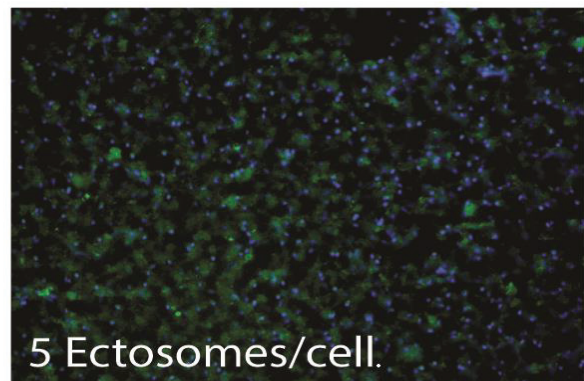
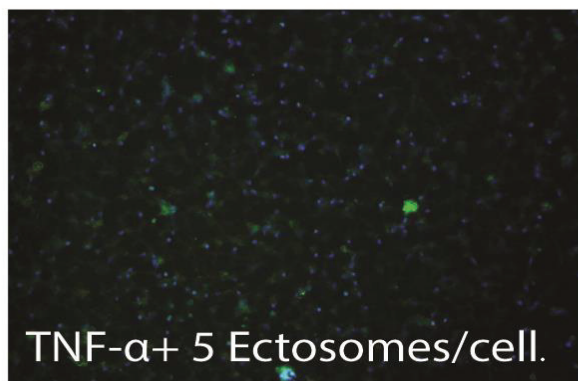
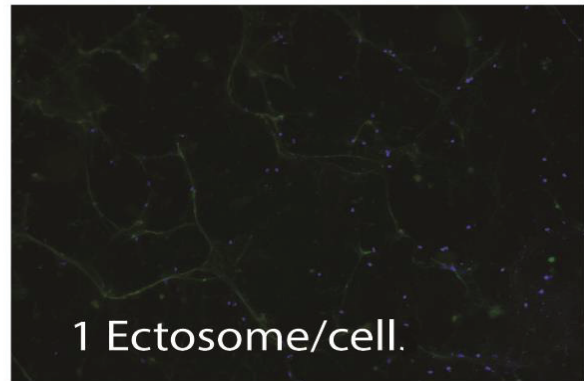
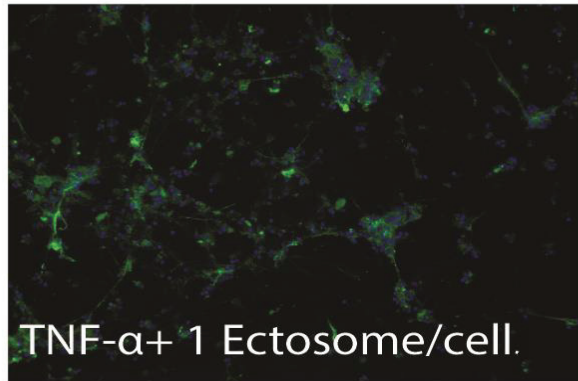
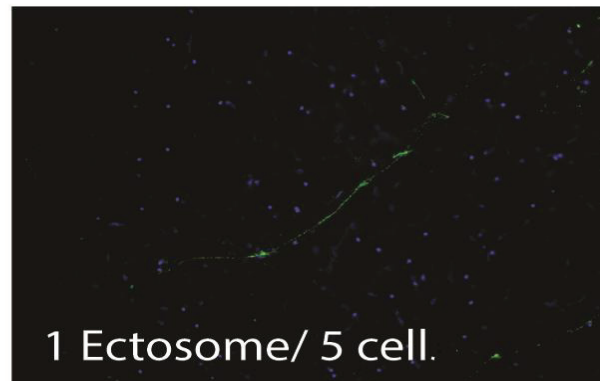
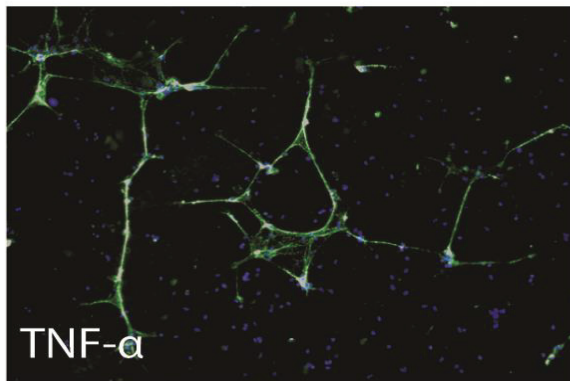


Figure 18. Effet des ectosomes neutrophiliques sur la NETose

Les neutrophiles ont été incubés sur des lamelles enduites de poly-L-lysine pendant 4h avec ou sans TNF- α (100 U/ml) et/ou ectosomes. La NETose a été observée à l'aide du *PlaNET reagent* et d'un marqueur nucléaire (Hoechst 33342). Images représentatives d'une expérience.

9.8. Effet des ectosomes sur la production de cytokines

Puisque les ectosomes semblent affecter les réponses du neutrophile ayant des rôles pro-résolutions ou anti-inflammatoires, nous nous sommes demandé s'ils avaient aussi des effets inhibiteurs sur certaines réponses pro-inflammatoires. Afin de vérifier cela, nous avons stimulé des neutrophiles avec du TNF- α pour induire la production de certaines chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Osawa et *al.*, 2002). Les concentrations d'IL-8 en présence d'ectosomes et/ou de TNF- α ont été analysées par ELISA (figure 19). Tel que montré à la Fig 18, la présence d'ectosomes en grande quantité inhibe la relâche d'IL-8 par les neutrophiles stimulés au TNF- α . L'effet des ectosomes semble dose-dépendant puisque de faibles concentrations d'ectosomes ont peu ou pas d'effet sur la sécrétion d'IL-8. Finalement, lorsque les neutrophiles sont stimulés seulement par les ectosomes, la sécrétion d'IL-8 est semblable à celle des neutrophiles au repos (figure 19).

IL-8 relâché par les neutrophiles humains sous différentes conditions

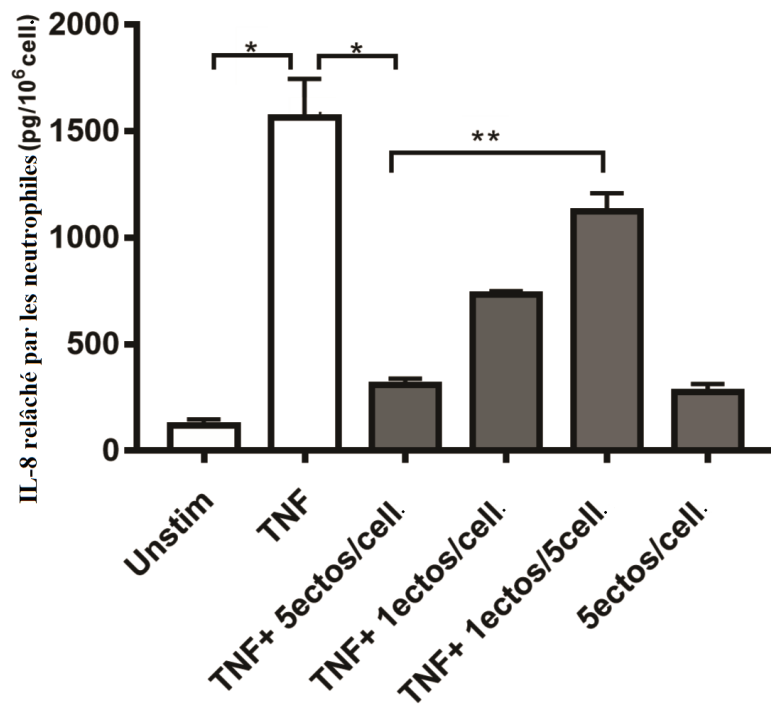


Figure 19. Effet des ectosomes sur la sécrétion d'IL-8 par le neutrophile humain

Les neutrophiles ont été stimulés par du TNF- α (100 U/ml, 6h, 37°C) en présence ou non de diverses concentrations d'ectosomes neutrophiliques. La sécrétion d'IL-8 a été mesurée par ELISA. Moyenne \pm SEM de 3 expériences indépendantes *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

10. Discussion

Lors de leur découverte et pendant plusieurs années, les vésicules extracellulaires étaient majoritairement considérées comme de simples débris cellulaires sans fonction précise. Depuis, de nombreuses études ont démontré l'importance de ces vésicules dans la régulation de plusieurs réponses physiologiques et dans la communication intercellulaire (Raposo et Stahl, 2019). C'est aujourd'hui un domaine de recherche en pleine expansion. Chez le neutrophile, la production de vésicules extracellulaires et les impacts de celles-ci sont encore peu étudiés. Il a été démontré que les neutrophiles produisent plusieurs types de vésicules extracellulaires comme les corps apoptotiques, les exosomes et les ectosomes (Hess *et al.*, 1999; Bratton et Henson, 2011; Vargas *et al.*, 2016). Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié les ectosomes neutrophiliques ainsi que quelques-uns de leurs effets sur les neutrophiles humains.

Tout d'abord, nous avons mis au point un protocole d'identification et d'isolement des ectosomes neutrophiliques. Pour l'identification, plusieurs méthodes sont disponibles telles que la cytométrie en flux, la microscopie à épifluorescence et la microscopie électronique (Chuo *et al.*, 2018; Görgens *et al.*, 2019). Pour nos besoins, nous avons privilégié la cytométrie en flux puisqu'elle offre un bon rapport entre précision et rapidité. La microscopie électronique a aussi été utilisée pour confirmer les résultats de la cytométrie et visualiser les ectosomes directement. Cependant, pour une utilisation fréquente, les protocoles de microscopie électronique sont trop longs à réaliser pour nos besoins. La microscopie à épifluorescence aurait pu être une solution pour visualiser rapidement les ectosomes. Cependant, avec ce type de microscopie, la précision laisse à désirer et ne permet pas de bien visualiser les microvésicules. C'est pourquoi nous avons opté pour la cytométrie en flux malgré le fait que l'on n'observe pas directement les ectosomes avec cette méthode.

Pour marquer les ectosomes en cytométrie de flux, plusieurs protocoles utilisent l'annexine-V puisque les phosphatidylsérines sont exposées à la surface de l'ectosome. Pour estimer la taille des ectosomes avec le FSC et la granulosité avec le SSC des billes de

calibration sont utilisées. Le paramètre SSC-width/SSC (ou FSC-width/FSC) est utilisé pour discriminer les événements simples des agrégats pendant l'analyse (Houtz et *al.*, 2004). Quelques protocoles ajoutent aussi des marqueurs spécifiques au type cellulaire. Dans notre cas, nous avons marqué les ectosomes avec un anti-CD66b puisque CD66b est spécifique aux granulocytes et qu'il se retrouve à la surface des ectosomes du neutrophile (Gustafson et *al.*, 2015; Gasser et *al.*, 2003). Finalement, les ectosomes sont des vésicules extracellulaires qui contiennent diverses protéines et molécules comme de l'ARNm et des enzymes (Cocucci et Meldolesi, 2015). Parmi ces enzymes, on retrouve des estérases. Les estérases hydrolysent la calcéine-AM, ce qui permet de marquer les microvésicules intactes. De plus, lorsque la membrane des ectosomes est perméabilisée, la fluorescence de la calcéine disparaît. Cela démontre que la calcéine se retrouve à l'intérieur des vésicules intactes (fig. 11E; Gray et *al.*, 2015).

Ce qui différencie notre méthode des autres méthodes utilisées habituellement, c'est l'utilisation de 3 marqueurs et de plusieurs paramètres d'analyse dans le but de visualiser avec précision les populations d'ectosomes intactes. Cette méthode d'identification nous permet aussi de procéder à un compte semi-quantitatif de la concentration d'ectosomes dans nos échantillons. Ce compte est crucial pour les expérimentations de cinétique de production et de stimulation des neutrophiles. Il est important de noter que certaines particules sont ignorées de l'analyse dû aux limites du cytomètre (*abort rate* des échantillons).

Notre méthode diffère également de celles habituellement utilisées dans la littérature du point de vue de la standardisation. Plusieurs protocoles utilisent des moyens indirects pour approximer le nombre de microvésicules et standardiser leurs résultats. Par exemple, des groupes utilisent des essais protéiques (i.e. Bradford) ou des essais lipidiques pour approximer le contenu total en protéines ou lipides dans leurs échantillons, et standardisent leurs résultats en fonction de ceux-ci (Hartjes et *al.*, 2019). Il s'agit cependant d'une standardisation indirecte qui peut varier énormément en fonction de la taille des vésicules, du type de cellules ayant produits les VEs, et même en fonction du stimulus ayant mené à la formation des VEs chez un même type cellulaire. De plus, ces méthodes sont généralement

longues à exécuter et ne permettent pas l'utilisation rapide des vésicules isolées. Il existe des équipements spécialisés comme le qNano Gold et le NanoSight NS300 qui permettent l'analyse des vésicules extracellulaires avec rapidité, exactitude et précision, mais leur disponibilité est récente, si bien qu'ils ne sont pas encore très répandus (Maas et *al.*, 2015; Akers et *al.*, 2016). Donc, bien que notre méthode ait certaines limites, elle est rapide, précise et accessible. De plus, elle permet un compte semi-quantitatif direct des microvésicules présentes. Cela permet d'éliminer les variations dues au stimulus utilisé et au type cellulaire, qui sont un problème dans les comptes lipidiques ou protéiques.

Nous avons aussi dû mettre en place un protocole de production des ectosomes pour en produire rapidement et en grande quantité. La majorité des protocoles utilisent des cellules stimulées avec des stimuli physiologiques, mais cette méthode peut s'avérer onéreuse et longue puisqu'il faut utiliser énormément de cellules et de stimuli pour isoler une quantité appréciable d'ectosomes. La méthode que nous avons privilégiée est la cavitation à l'azote, rapportée par Gao et *al.* (2017), et que nous avons adaptée. Un autre avantage de cette méthode est qu'on peut augmenter la densité de neutrophiles dans l'échantillon pour obtenir une plus grande quantité d'ectosomes dans le même laps de temps. L'une des limites de cette méthode est que les ectosomes obtenus ne sont pas exactement les mêmes que ceux obtenus avec chacun des stimuli physiologiques. En effet, comme mentionné dans l'introduction, le contenu et les molécules de surface des ectosomes peuvent varier en fonction du stimulus menant à leur production. Donc, le contenu des ectosomes produits par cavitation à l'azote est probablement différent de celui des ectosomes produits à l'aide de stimuli physiologiques. Donc, il est possible que la réaction des neutrophiles ne soit pas exactement la même lorsqu'ils sont stimulés par les ectosomes produits par cavitation à l'azote ou par l'un des stimuli physiologiques. Cependant, nous avons pu établir que les caractéristiques étaient tout de même très similaires entre les microvésicules issues des deux protocoles, comme l'avaient noté Gao et *al.* (Gao et *al.*, 2017).

Finalement, pour pouvoir utiliser les ectosomes, nous avons développé un protocole d'isolement des ectosomes neutrophiliques utilisant la centrifugation différentielle. Plusieurs

autres méthodes existent et sont couramment utilisées dans la littérature. Il y a le trieur de cellules qui pourrait potentiellement être utilisé, mais la sensibilité de l'équipement disponible dans la plateforme institutionnelle n'est pas assez grande pour qu'on puisse trier les ectosomes de nos échantillons. Il y a aussi les méthodes par ultrafiltration, privilégiées pour les essais cliniques (Li et *al.*, 2017), mais elles sont peu accessibles en raison de leur coût. Plusieurs autres techniques d'isolement existent (Li et *al.*, 2017), mais elles peuvent affecter les caractéristiques des ectosomes isolés, ou elles requièrent de l'équipement spécialisé. La meilleure approche dans notre cas était donc la centrifugation différentielle. La majorité des protocoles d'isolement par centrifugation différentielle ne conviennent pas aux ectosomes neutrophiliques produits par cavitation à l'azote. En effet, ils ne prennent pas en compte la présence de plusieurs autres corpuscules chez le neutrophile, comme les granules ou les mitochondries. Les granules sont des vésicules intracellulaires chez le neutrophile, mais lorsque la cavitation est utilisée, elle se retrouve dans le cavitat (Borregaard et *al.*, 1983). Pour culotter les microvésicules, une centrifugation de 10 000-15 000g est souvent utilisée (100 000g pour les exosomes). À cette vitesse de centrifugation, certaines granules se retrouvent dans le culot (Dzau et *al.*, 1987) ce qui risque fort d'affecter les résultats obtenus lors de la stimulation des cellules avec les ectosomes. Notre première centrifugation à 1000g nous permet d'enlever les débris et les cellules. Le surnageant est ensuite centrifugé à 4000g et, à cette vitesse, nous récupérons entre 75 et 85% des ectosomes neutrophiliques comme démontré dans la figure 13A. La limite de cette méthode est que nous ne récupérons pas les ectosomes ayant une densité plus faible, ce qui pourrait affecter les résultats obtenus. Nous considérons toutefois qu'il est plus important d'éviter une contamination par des granules, que d'obtenir 100% des ectosomes.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons démontré qu'il y a une production d'ectosomes constitutive chez les neutrophiles, même au repos, et que différents stimuli augmentent cette production de plusieurs fois. Le LPS, le TNF- α et le fMLP stimulent tous la production d'ectosomes alors que le GM-CSF ne semble pas avoir d'effet significatif sur celle-ci. Ces résultats sont en accord avec ce que l'on retrouve dans la littérature (Hong, 2018). De plus, nous avons démontré que la production d'ectosomes par des cellules

stimulées au fMLP, LPS ou TNF- α est augmentée de plusieurs fois comparativement à la production par des cellules non stimulées. (Figure 14A).

Dans la figure 15A, nous montrons que les voies de signalisation Src et TAK1 semblent impliquées dans la production des ectosomes neutrophiliques. Pour la voie Src, il a été démontré chez les cellules gliales qu'elle est impliquée dans la production d'ectosomes en induisant la migration des A-SMase à la membrane plasmique (Bianco *et al.*, 2009). Pour ce qui est de TAK1, plusieurs études réalisées dans le laboratoire ont démontré son importance dans la régulation des réponses fonctionnelle du neutrophile (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011; Fortin *et al.*, 2013; Simard *et al.*, 2015; Sylvain-Prévost *et al.*, 2015; Tatsiy et McDonald, 2018). Donc, les résultats obtenus et qui montrent que TAK1 joue un rôle dans la régulation de la production d'ectosomes sont très plausibles. Cependant, l'inhibition des voies de signalisations n'affecte qu'une faible partie de la production d'ectosomes. La question reste donc à élucider, qu'est-ce qui contrôle la production d'ectosomes chez le neutrophile? Plusieurs avenues restent à explorer... Il est possible que la production d'ectosomes soit un processus où la production est simplement augmentée par l'état d'activation des cellules plutôt que par une mobilisation de certaines voies de signalisation en particulier. Toutefois, le cas du GM-CSF cadre mal avec cette explication. Il est clair que des études plus poussées seront nécessaires afin d'élucider cet aspect de la production d'ectosomes.

Dans la littérature, des effets des ectosomes neutrophiliques sur les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules NK ont déjà été rapportés (Johnson III *et al.*, 2014). Par exemple, chez le macrophage, les ectosomes neutrophiliques favorisent la mise en place du phénotype prorésolution (Timár *et al.*, 2013) et ils inhibent la maturation nickel-dépendante des cellules dendritiques (Turbica, 2015). À ce jour, il n'y avait encore aucune étude ayant démontré des effets des ectosomes neutrophiliques sur les neutrophiles. Dans ce mémoire, nous avons démontré que les ectosomes neutrophiliques ont des effets marqués sur les réponses fonctionnelles des cellules dont ils proviennent.

Premièrement, nous avons démontré que les ectosomes neutrophiliques affectent la nécrose et la survie des neutrophiles, l'effet varie selon la quantité d'ectosomes présents. Une grande concentration d'ectosomes stimule la nécrose du neutrophile humain à 20h alors qu'une faible concentration a plutôt l'effet inverse. Le mécanisme le plus plausible pour expliquer ces résultats est que la présence de molécules pro-inflammatoires et réactives à l'intérieur des ectosomes neutrophiliques affecte la survie et la mort des neutrophiles. En effet, il a été démontré que les ectosomes neutrophiliques contiennent des granules (Hess et *al.*, 1999). Il est aussi possible qu'ils contiennent des molécules pro-inflammatoires et d'autres molécules pouvant causer des dommages aux cellules environnantes. S'il y a une petite quantité d'ectosomes, les molécules pro-inflammatoires vont activer les neutrophiles et augmenter leur survie ce qui concorde avec les résultats obtenus. Dans ce cas-ci, il est possible que les molécules granulaires, les ROS et les autres protéines réactives ne soient pas présentes en assez grande quantité pour causer des dommages importants et diminuer la survie du neutrophile. En augmentant le ratio d'ectosomes par cellule, il est possible que la quantité de molécules réactives devienne assez grande pour causer des dommages importants aux neutrophiles et stimuler leur mort ce qui concorde aussi avec les résultats obtenus.

Nous avons aussi montré que les ectosomes neutrophiliques ont un effet sur la production de cytokines chez le neutrophile humain. La production d'IL-8 chez le neutrophile humain stimulé au TNF- α est fortement inhibée par la présence d'une grande quantité d'ectosomes neutrophiliques alors qu'une faible quantité n'a pas d'impact significatif sur la production de cette cytokine. Deux mécanismes d'action peuvent expliquer cet effet. Le premier est le fait que les ectosomes stimulent la nécrose du neutrophile même à des temps aussi courts que 6 h (données non montrées) ce qui implique qu'il y a moins de neutrophiles en état de produire de l'IL-8 en présence d'ectosomes. Le second mécanisme est via l'inhibition de TAK1. Dans une étude de 2018, Marwick et *al.* ont démontré que les ectosomes neutrophiliques affectaient NF- κ B en bloquant TAK1 et les IKKs chez le macrophage. Il est donc possible qu'ils affectent aussi ces molécules de signalisation chez les neutrophiles. Comme expliqué précédemment, TAK1 est une molécule clef de la régulation des réponses fonctionnelles du neutrophile humain, dont la production de

cytokines (Ear *et al.*, 2010; Fortin *et al.*, 2011; Fortin *et al.*, 2013; Simard *et al.*, 2015; Sylvain-Prévost *et al.*, 2015; Tatsiy et McDonald, 2018).

Finalement, nous avons aussi observé les effets des ectosomes neutrophiliques sur la NETose. Comme nous l'avons montré à la figure 18, les ectosomes neutrophiliques stimulent la NETose en présence ou non de stimuli physiologiques comme le TNF- α . Lorsqu'une grande concentration d'ectosomes est ajoutée, on observe une surstimulation de la NETose. Un effet qui a aussi été observée avec la stimulation par le PMA. Cependant, une quantification standardisée de la NETose (NET index) devra être faite pour confirmer ces observations. Il est connu que la stimulation du neutrophile par différentes classes de stimuli tels que le PMA, le fMLP et le TNF- α active différentes voies de signalisation et stimule la NETose (Takei *et al.*, 1996, Brinkmann *et al.*, 2004). Un mécanisme similaire pourrait expliquer la stimulation de la NETose par les ectosomes. Il est possible qu'en fusionnant avec le neutrophile et en relâchant son contenu dans le cytosol du PMN, l'ectosome active diverses voies de signalisation et stimule la production de NETs. Finalement, la phagocytose des ectosomes par les neutrophiles pourrait aussi stimuler la NETose. Lors de la phagocytose, il y a la formation du phagolysosome ce qui mène à la production de ROS. Or, dans la littérature, il est démontré que la production de NETs est stimulée par les ROS (Stoiber *et al.*, 2015). Donc, les ectosomes pourraient favoriser la NETose en stimulant la production de ROS lorsqu'ils sont phagocytés, en se liant aux récepteurs membranaires du neutrophile ou en fusionnant avec la membrane du neutrophile. Cependant, ce ne sont que des propositions de mécanismes, d'autres études plus approfondies sont nécessaires à l'identification du mécanisme impliqué dans la production de NETs chez les neutrophiles stimulés par des ectosomes neutrophiliques.

11. Conclusion

En conclusion, notre protocole d'identification et de purification des ectosomes neutrophiliques est facilement reproductible. Il nous permet d'identifier, d'obtenir et de compter une grande quantité de neutrophiles rapidement et simplement à l'aide d'équipements et de réactifs qui sont accessibles dans la plupart des laboratoires de recherche.

Différents stimuli (physiologiques ou non) augmentent la production d'ectosomes neutrophiliques, et les voies TAK1 et Src semblent impliquées. Le neutrophile est aussi affecté par les ectosomes qu'il produit. Les ectosomes neutrophiliques ont donc un effet paracrine ou autocrine. À forte dose, ils promeuvent l'apoptose, la NETose et inhibent la production d'IL-8. À faible concentration toutefois, ils protègent de l'apoptose, sans affecter les autres réponses. Une limite importante de notre étude est le fait qu'il n'existe pas d'inhibiteurs connus des ectosomes neutrophiliques, et qu'il n'y a pas de méthodes pour les retirer du milieu de culture au fur et à mesure qu'ils sont produits. Il nous est donc impossible d'empêcher la formation d'ectosomes pour observer plus en détail les effets de leur absence sur les réponses fonctionnelles du neutrophile.

Notre étude est donc importante puisqu'elle montre pour la première fois que les ectosomes neutrophiliques ont un effet sur les réponses du neutrophile humain et qu'ils ont probablement un rôle important dans l'auto-régulation du neutrophile humain. Leur étude nous permet de mieux comprendre la régulation des réponses du neutrophile et ses divers rôles dans la réponse immunitaire.

Des expériences supplémentaires devront être faites pour observer les effets des ectosomes sur d'autres cytokines du neutrophile comme le MIP-1 β (pro-inflammatoire) et le TGF β (anti-inflammatoire). Ces effets sur les cytokines devront aussi être examinés par qPCR, afin de déterminer si les ectosomes affectent la transcription génique. De plus, il serait

intéressant d'étudier les effets des ectosomes neutrophiliques sur les voies de signalisation du neutrophile à l'aide de l'immunobuvardage de type Western. Cela donnerait probablement des indices importants qui permettraient de mieux comprendre l'interaction entre les ectosomes neutrophiliques et les neutrophiles humains. Il serait enfin intéressant de vérifier si les PLB-985 différenciés en neutrophiles peuvent produire des ectosomes et si leurs effets sont similaires à ceux provenant de cellules primaires.

Dans une optique plus globale, les ectosomes neutrophiliques pourraient avoir plusieurs applications thérapeutiques. Leurs effets pro-apoptotiques et sur la production de cytokines pourrait être utile dans le traitement de maladies pro-inflammatoire où l'infiltration de neutrophiles est importante. Quelques études chez la souris ont démontré des effets positifs des ectosomes neutrophiliques pour la protection du cartilage dans l'arthrite et pour le traitement de la goutte (Headland et *al.*, 2015; Cumpelik et *al.*, 2016). Les ectosomes neutrophiliques peuvent aussi être utilisés comme vésicules de transport pour certains traitements. Une étude de Gao et *al.* a en effet démontré le piceatannol diminue plus efficacement l'inflammation pulmonaire chez la souris lorsqu'il est chargé dans les microvésicules plutôt que lorsqu'il est injecté seul dans le milieu extracellulaire (Gao et *al.*, 2017).

12. Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes parents, Alain et Claudette pour leurs encouragements et leur soutien sans faille dans tous les projets que j'entreprends. Je remercie aussi mon frère, Antoine, qui est toujours là pour m'épauler, peu importe la situation.

Je veux aussi remercier ma conjointe Audrey qui m'a supportée dans tous mes projets ces dernières années et qui m'a aussi encouragé à continuer et à persévérer lorsque le moral n'y était pas.

J'aimerais remercier Patrick McDonald, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire dans le cadre de ma maîtrise et, pour m'avoir donné l'occasion de parfaire mes connaissances et mes compétences sous sa supervision.

Finalement, je tiens à remercier les membres du laboratoire (passés et présents), Olga, Thomas, Anette, Thonin et Tanya pour leur aide dans la réalisation de mes expériences et de ce projet de recherche.

13. Références

1. Adell MAY, Migliano SM, Upadhyayula S, Bykov YS, Sprenger S, Pakdel M, et al. Recruitment dynamics of ESCRT-III and Vps4 to endosomes and implications for reverse membrane budding. *eLife* [Internet]. 2017 Oct;6. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29019322>
2. Afonso PV, Janka-Junttila M, Lee YJ, McCann CP, Oliver CM, Aamer KA, et al. LTB4 Is a Signal-Relay Molecule during Neutrophil Chemotaxis. *Developmental Cell*. 2012 May;22(5):1079–1091.
3. Ainsworth BE, Haskell WL, Herrmann SD, Meckes N, Bassett DR, Tudor-Locke C, et al. 2011 Compendium of Physical Activities: A Second Update of Codes and MET Values. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2011 Aug;43(8):1575–81.
4. Akers JC, Ramakrishnan V, Nolan JP, Duggan E, Fu C-C, Hochberg FH, et al. Comparative Analysis of Technologies for Quantifying Extracellular Vesicles (EVs) in Clinical Cerebrospinal Fluids (CSF). Yin HH, editor. *PLoS ONE*. 2016 Feb 22;11(2):e0149866.
5. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 2000 Feb;12(1):59–63.
6. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006 Feb;124(4):783–801.
7. American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of biological chemistry*. [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; Consulté sur <http://www.jbc.org/content/269/28/18485.short>
8. Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C. INTERLEUKIN-1 RECEPTOR ANTAGONIST: Role in Biology. *Annual Review of Immunology*. 1998 Apr;16(1):27–55.
9. Atallah M, Krispin A, Trahtemberg U, Ben-Hamron S, Grau A, Verbovetski I, et al. Constitutive Neutrophil Apoptosis: Regulation by Cell Concentration via S100 A8/9 and the MEK – ERK Pathway. Bonini MG, editor. *PLoS ONE*. 2012 Feb 17;7(2):e29333.
10. Avdi NJ, Nick JA, Whitlock BB, Billstrom MA, Henson PM, Johnson GL, et al. Tumor Necrosis Factor- α Activation of the c-Jun N-terminal Kinase Pathway in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan;276(3):2189–2199.
11. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *American Journal of Medicine*. 2000 Jul;109(1):33–44.

12. Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental cell*. 2002 Aug;3(2):271–82.
13. Balhara J, Gounni AS. The alveolar macrophages in asthma: a double-edged sword. *Mucosal Immunology*. 2012 Nov;5(6):605–609.
14. Bargatze RF. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1994 Nov 1;180(5):1785–92.
15. Baroni M, Pizzirani C, Pinotti M, Ferrari D, Adinolfi E, Calzavarini S, et al. Stimulation of P2 (P2X7) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *The FASEB Journal*. 2007 Jun;21(8):1926–1933.
16. Batlle E, Massagué J. Transforming Growth Factor- β Signaling in Immunity and Cancer. *Immunity*. 2019 Apr;50(4):924–940.
17. Bell E. Neutrophil NETworks. *Nature Reviews Immunology*. 2004 Apr;4(4):244–244.
18. Bergmann A. Survival Signaling Goes BAD. *Developmental Cell*. 2002 Nov;3(5):607–608.
19. Besse A, Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Maddineni U, Lin S-C, et al. TAK1-dependent Signaling Requires Functional Interaction with TAB2/TAB3. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Nov;282(6):3918–3928.
20. Bianco F, Perrotta C, Novellino L, Francolini M, Riganti L, Menna E, et al. Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO J*. 2009 Apr 22;28(8):1043–54.
21. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *Journal of periodontology*. 1993 May;64(5 Suppl):456–60.
22. Bommakanti RK, Klotz K-N, Dratz EA, Jesaitis AJ. A carboxyl-terminal tail peptide of neutrophil chemotactic receptor disrupts its physical complex with G protein. *Journal of Leukocyte Biology*. 1993 Dec;54(6):572–577.
23. Bond PJ, Faraldo-Gómez JD. Molecular mechanism of selective recruitment of Syk kinases by the membrane antigen-receptor complex. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Jul;286(29):25872–81.
24. Borregaard N, Heiple JM, Simons ER, Clark RA. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J Cell Biol*. 1983 Jul;97(1):52–61.

25. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 2011 Aug;32(8):350–7.
26. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004 Mar;303(5663):1532–1535.
27. Bussolino F, Sironi M, Bocchietto E, Mantovani A. Synthesis of platelet-activating factor by polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-8. *The Journal of biological chemistry.* 1992 Jul;267(21):14598–603.
28. Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *The Journal of Immunology.* 2013 Apr;190(8):4136–4148.
29. Carvalho LO, Aquino EN, Neves ACD, Fontes W. The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function: THE NEUTROPHIL NUCLEUS. *J Cell Biochem.* 2015 Sep;116(9):1831–6.
30. Castro-Alcaraz S, Miskolci V, Kalasapudi B, Davidson D, Vancurova I. NF- κ B Regulation in Human Neutrophils by Nuclear I κ B α : Correlation to Apoptosis. *The Journal of Immunology.* 2002 Oct;169(7):3947–3953.
31. Chiaruttini N, Redondo-Morata L, Colom A, Humbert F, Lenz M, Scheuring S, et al. Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation. *Cell.* 2015 Nov;163(4):866–879.
32. Chiaruttini N, Roux A. Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments. *Current Opinion in Cell Biology.* 2017 Aug;47:126–135.
33. Chong ZZ, Maiese K. The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol Histopathol.* 2007;22(11):1251–67.
34. Chuo ST-Y, Chien JC-Y, Lai CP-K. Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. *J Biomed Sci.* 2018 Dec;25(1):91.
35. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine.* 2007 Apr;13(4):463–469.
36. Cloutier A, Ear T, Blais-Charron E, Dubois CM, McDonald PP. Differential involvement of NF- κ B and MAP kinase pathways in the generation of inflammatory cytokines by human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology.* 2007 Feb;81(2):567–577.
37. Cloutier A, Ear T, Borissevitch O, Larivée P, McDonald PP. Inflammatory cytokine expression is independent of the c-Jun N-terminal kinase/AP-1 signaling cascade in

- human neutrophils. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2003 Oct;171(7):3751–61.
38. Cloutier A, Guindi C, Larivée P, Dubois CM, Amrani A, McDonald PP. Inflammatory Cytokine Production by Human Neutrophils Involves C/EBP Transcription Factors. *The Journal of Immunology*. 2009 Jan;182(1):563–571.
 39. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*. 2015 Jun;25(6):364–372.
 40. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*. 2009 Feb;19(2):43–51.
 41. Cowburn AS, Cadwallader KA, Reed BJ, Farahi N, Chilvers ER. Role of PI3-kinase-dependent Bad phosphorylation and altered transcription in cytokine-mediated neutrophil survival. *Blood*. 2002 Sep;100(7):2607–2616.
 42. Croker BA, O'Donnell JA, Nowell CJ, Metcalf D, Dewson G, Campbell KJ, et al. Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011 Aug;108(32):13135–40.
 43. Cumpelik A, Ankli B, Zecher D, Schifferli JA. Neutrophil microvesicles resolve gout by inhibiting C5a-mediated priming of the inflammasome. *Ann Rheum Dis*. 2016;75(6):1236–45.
 44. da Silva FM, Massart-Leën AM, Burvenich C. Development and maturation of neutrophils. *The Veterinary quarterly*. 1994 Dec;16(4):220–225.
 45. Daigle I, Simon HU. Alternative functions for TRAIL receptors in eosinophils and neutrophils. *Swiss medical weekly*. 2001 May;131(17–18):231–7.
 46. Daigle I, Simon H-U. Critical Role for Caspases 3 and 8 in Neutrophil But Not Eosinophil Apoptosis. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2001 Oct;126(2):147–156.
 47. Daigle I, Yousefi S, Colonna M, Green DR, Simon H-U. Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med*. 2002 Jan;8(1):61–7.
 48. Dale DC, Boxer L, Conrad Liles W. The phagocytes: Neutrophils and monocytes. *Blood*. 2008 Aug;112(4):935–945.
 49. Dang PM, Dewas C, Gaudry M, Fay M, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, et al. Priming of human neutrophil respiratory burst by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) involves partial phosphorylation of p47(phox). *The Journal of biological chemistry*. 1999 Jul;274(29):20704–8.

50. De Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse [Internet]. Vol. 16. 2016. 378–391 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27231052>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5367630>
<http://www.nature.com/articles/nri.2016.49>
51. del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, López JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood*. 2005 Sep;106(5):1604–1611.
52. Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schoni MH, Blaser K, et al. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: A general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999 Nov;96(23):13330–13335.
53. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annual Review of Immunology*. 2009 Apr;27(1):519–550.
54. Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG. The role of formylated peptides and formyl peptide receptor 1 in governing neutrophil function during acute inflammation. *American Journal of Pathology*. 2015 May;185(5):1172–1184.
55. Dujardin S, Bégard S, Caillierez R, Lachaud C, Delattre L, Carrier S, et al. Ectosomes: A New Mechanism for Non-Exosomal Secretion of Tau Protein. Avila J, editor. *PLoS ONE*. 2014 Jun;9(6):e100760.
56. Dzau VJ, Gonzalez D, Kaempfer C, Dubin D, Wintroub BU. Human neutrophils release serine proteases capable of activating prorenin. *Circ Res*. 1987 Apr;60(4):595–601.
57. Ear T, Cloutier A, McDonald PP. Constitutive nuclear expression of the I kappa B kinase complex and its activation in human neutrophils. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2005 Aug;175(3):1834–42.
58. Ear T, Fortin CF, Simard FA, McDonald PP. Constitutive Association of TGF- β -Activated Kinase 1 with the I κ B Kinase Complex in the Nucleus and Cytoplasm of Human Neutrophils and Its Impact on Downstream Processes. *The Journal of Immunology*. 2010 Apr;184(7):3897–3906.
59. Ear T, Tatsiy O, Allard FL, McDonald PP. Regulation of Discrete Functional Responses by Syk and Src Family Tyrosine Kinases in Human Neutrophils. *Journal of Immunology Research*. 2017 Apr;2017:1–7.
60. Edwards SW, Hallett MB. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Immunology today*. 1997 Jul;18(7):320–4.
61. Eken C, Martin PJ, Sadallah S, Treves S, Schaller M, Schifferli JA. Ectosomes

- released by polymorphonuclear neutrophils induce a MerTK-dependent anti-inflammatory pathway in macrophages. *The Journal of biological chemistry*. 2010 Dec;285(51):39914–21.
62. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidalo MA, Dang PMC. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation [Internet]. Vol. 273. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2016. 180–193 p. Consulté sur <http://doi.wiley.com/10.1111/imr.12447>
 63. Elkon KB, Rhiannon JJ. Innate immunity. In: *Scleroderma: From Pathogenesis to Comprehensive Management* [Internet]. NIH Public Access; 2012. p. 191–197. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19932920>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2832725>
 64. Fabrikant G, Lata S, Riches JD, Briggs JAG, Weissenhorn W, Kozlov MM. Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III. Pande VS, editor. *PLoS Computational Biology*. 2009 Nov;5(11):e1000575.
 65. Fortin CF, Cloutier A, Ear T, Sylvain-Prévost S, Mayer TZ, Bouchelaghem R, et al. A class IA PI3K controls inflammatory cytokine production in human neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2011 Jun;41(6):1709–1719.
 66. Fortin CF, Ear T, McDonald PP. Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils. *The FASEB Journal*. 2009 Jan;23(1):194–203.
 67. Fortin CF, Mayer TZ, Cloutier A, McDonald PP. Translational control of human neutrophil responses by MNK1. *Journal of Leukocyte Biology*. 2013 Oct;94(4):693–703.
 68. Fossati G, Mazzucchelli I, Gritti D, Ricevuti G, Edwards SW, Moulding DA, et al. In vitro effects of GM-CSF on mature peripheral blood neutrophils. *International Journal of Molecular Medicine*. 1998 Jun;1(6):943–51.
 69. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*. 2007 Jan;176(2):231–241.
 70. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008 Nov;125(3):281–288.
 71. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International Immunopharmacology*. 2013 Nov;17(4):1185–1197.
 72. Gao J, Wang S, Wang Z. High yield, scalable and remotely drug-loaded neutrophil-derived extracellular vesicles (EVs) for anti-inflammation therapy. *Biomaterials*. 2017 Aug;135:62–73.

73. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez J-C, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Experimental cell research*. 2003 May;285(2):243–57.
74. Geering B, Gurzeler U, Federzoni E, Kaufmann T, Simon HU. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood*. 2011 Jun;117(22):5953–5962.
75. Genschmer KR, Russell DW, Lal C, Szul T, Bratcher PE, Noerager BD, et al. Activated PMN Exosomes: Pathogenic Entities Causing Matrix Destruction and Disease in the Lung. *Cell*. 2019 Jan;176(1–2):113–126.e15.
76. Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002 Apr;109 Suppl:S81–96.
77. Görgens A, Bremer M, Ferrer-Tur R, Murke F, Tertel T, Horn PA, et al. Optimisation of imaging flow cytometry for the analysis of single extracellular vesicles by using fluorescence-tagged vesicles as biological reference material. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2019 Jan;8(1):1587567.
78. Gray WD, Mitchell AJ, Searles CD. An accurate, precise method for general labeling of extracellular vesicles. *MethodsX*. 2015;2:360–7.
79. Greenlee-Wacker MC. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunological Reviews*. 2016 Sep;273(1):357–370.
80. Gustafson MP, Lin Y, Maas ML, Van Keulen VP, Johnston PB, Peikert T, et al. A Method for Identification and Analysis of Non-Overlapping Myeloid Immunophenotypes in Humans. Unutmaz D, editor. *PLoS ONE*. 2015 Mar 23;10(3):e0121546.
81. Hanna VS, Hafez EAA. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*. 2018 May;11:23–32.
82. Hannah S, Nadra I, Dransfield I, Pryde JG, Rossi AG, Haslett C. Constitutive neutrophil apoptosis in culture is modulated by cell density independently of β_2 integrin-mediated adhesion. *FEBS Letters*. 1998 Jan 9;421(2):141–6.
83. Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *The Journal of Cell Biology*. 2008 Jan;180(2):389–402.
84. Hartjes T, Mytnyk S, Jenster G, van Steijn V, van Royen M. Extracellular Vesicle Quantification and Characterization: Common Methods and Emerging Approaches. *Bioengineering*. 2019 Jan 16;6(1):7.
85. He HQ, Ye RD. The formyl peptide receptors: Diversity of ligands and mechanism for recognition. *Molecules*. 2017 Mar;22(3):455.

86. Heinisch IVWM, Daigle I, Knöpfli B, Simon H-U. CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *European Journal of Immunology*. 2000 Dec;30(12):3441–3446.
87. Hemmings BA, Restuccia DF. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [Internet]. 2012;4(9). Consulté sur <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428770/>
88. Hercus TR, Broughton SE, Ekert PG, Ramshaw HS, Perugini M, Grimbaldston M, et al. The GM-CSF receptor family: Mechanism of activation and implications for disease. *Growth Factors*. 2012 Apr;30(2):63–75.
89. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, et al. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: Linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*. 2009;114(7):1289–1298.
90. Hess C, Sadallah S, Hefti A, Landmann R, Schifferli JA. Ectosomes released by human neutrophils are specialized functional units. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 1999 Oct;163(8):4564–73.
91. Hirose M, Kitano J, Nakajima Y, Moriyoshi K, Yanagi S, Yamamura H, et al. Phosphorylation and Recruitment of Syk by Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif-based Phosphorylation of Tamalin. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jul;279(31):32308–32315.
92. Hoffstein ST, Friedman RS, Weissmann G. Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils. *The Journal of Cell Biology*. 1982 Oct;95(1):234–241.
93. Hong C-W. Extracellular Vesicles of Neutrophils. *Immune network*. 2018 Dec;18(6):e43.
94. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Research*. 2011 Jun;71(11):3792–3801.
95. Houtz B, Trotter J, Sasaki D. BD FACService TECHNOTES. BD FACService TECHNOTES. 2004 Oct;9(4).
96. Iwasaki A, Medzhitov R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 2015 Apr;16(4):343–353.
97. Janeway CA, Medzhitov R. INNATE IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology*. 2002 Apr;20(1):197–216.
98. Johnson BL, Kuethe JW, Caldwell CC, Caldwell CC. Neutrophil derived microvesicles: emerging role of a key mediator to the immune response. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2014;14(3):210–7.

99. Jones DA, Abbassi O, McIntire LV, McEver RP, Smith CW. P-selectin mediates neutrophil rolling on histamine-stimulated endothelial cells. *Biophysical Journal*. 1993 Oct;65(4):1560–9.
100. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology*. 2016 Jan;12(1):49–62.
101. Kalra H, Drummen G, Mathivanan S. Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016 Feb;17(2):170.
102. Kaplan KB, Bibbins KB, Swedlow JR, Arnaud M, Morgan DO, Varmus HE. Association of the amino-terminal half of c-Src with focal adhesions alters their properties and is regulated by phosphorylation of tyrosine 527. *The EMBO journal*. 1994 Oct;13(20):4745–56.
103. Kato T, Noma H, Kitagawa M, Takahashi T, Oshitani N, Kitagawa S. Distinct role of c-Jun N-terminal kinase isoforms in human neutrophil apoptosis regulated by tumor necrosis factor- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2008 Apr;28(4):235–243.
104. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: A systems biology-level approach. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*. 2009 Nov;1(3):309–333.
105. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016 Feb;113(8):E968–77.
106. Kulshreshtha A, Ahmad T, Agrawal A, Ghosh B. Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2013 Apr;131(4):1194–1203.e14.
107. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*. 2011 Jan;30(1):16–34.
108. Lacy P. A new way of trapping bugs: neutrophil microvesicles. *Blood*. 2013 Jan;121(3):420–421.
109. Langereis JD. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh Migr*. 2013 Dec;7(6):476–81.
110. Lawrence SM, Corriden R, Nizet V. The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [Internet]. 2018 Feb;82(1). Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29436479>

111. Lebien TW, Tedder TF. B lymphocytes: How they develop and function. *Blood*. 2008 Sep;112(5):1570–1580.
112. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, et al. A role for IL-18 in neutrophil activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001 Sep;167(5):2879–86.
113. Li P, Kaslan M, Lee SH, Yao J, Gao Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*. 2017;7(3):789–804.
114. Liu L, Sun B. Neutrophil pyroptosis: new perspectives on sepsis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019 Jun;76(11):2031–2042.
115. Long H, Zhang F, Xu N, Liu G, Diener DR, Rosenbaum JL, et al. Comparative Analysis of Ciliary Membranes and Ectosomes. *Current biology : CB*. 2016;26(24):3327–3335.
116. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation. *American Journal of Hematology*. 2008 Apr;83(4):288–295.
117. Maas SLN, de Vrij J, van der Vlist EJ, Geragousian B, van Bloois L, Mastrobattista E, et al. Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics. *Journal of Controlled Release*. 2015 Feb;200:87–96.
118. Marwick JA, Mills R, Kay O, Michail K, Stephen J, Rossi AG, et al. Neutrophils induce macrophage anti-inflammatory reprogramming by suppressing NF- κ B activation. *Cell Death Dis*. 2018 Jun;9(6):665.
119. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2014 Jan;9(1):181–218.
120. Mayer TZ, Simard FA, Cloutier A, Vardhan H, Dubois CM, McDonald PP. The p38-MSK1 Signaling Cascade Influences Cytokine Production through CREB and C/EBP Factors in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2013 Oct;191(8):4299–4307.
121. McCullough J, Fisher RD, Whitby FG, Sundquist WI, Hill CP. ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008 Jun;105(22):7687–91.
122. McCullough J, Frost A, Sundquist WI. Structures, Functions, and Dynamics of ESCRT-III/Vps4 Membrane Remodeling and Fission Complexes. *Annual review of cell and developmental biology*. 2018;34:85–109.
123. McDonald PP, Bald A, Cassatella MA. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood*. 1997 May;89(9):3421–33.

124. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Current Biology*. 2018 Apr;28(8):R435–R444.
125. Meng Y, Roux B. Locking the Active Conformation of c-Src Kinase through the Phosphorylation of the Activation Loop. *Journal of Molecular Biology*. 2014 Jan;426(2):423–435.
126. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury [Internet]. Vol. 20. Mary Ann Liebert, Inc.; 2014. 1126–1167 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23991888>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3929010>
127. Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Bréchar S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *Journal of Immunology Research*. 2015 Oct;2015:1–15.
128. Nakanishi M, Rosenberg DW. Multifaceted roles of PGE2 in inflammation and cancer. *Seminars in immunopathology*. 2013 Mar;35(2):123–37.
129. Nakayama M. Macrophage recognition of crystals and nanoparticles [Internet]. Vol. 9. Frontiers; 2018. 103 p. Consulté sur <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00103/full>
130. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nature Immunology*. 2014 Jul;15(7):602–611.
131. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: An integrated view [Internet]. Vol. 219. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2007. 88–102 p. Consulté sur <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-065X.2007.00550.x>
132. Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH oxidase activation and bacterial resistance [Internet]. Vol. 7. Frontiers Media SA; 2017. 373 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28890882>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5574878>
133. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011 Aug;90(2):271–284.
134. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*. 1999 Jan;10(1):127–36.
135. Ortega-Gómez A, Perretti M, Soehnlein O. Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Molecular Medicine*. 2013 May;5(5):661–674.
136. Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Asano T, Nozawa Y, et al. Tumor

- necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infection and immunity*. 2002 Nov;70(11):6294–301.
137. Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A(2)-induced platelet aggregation. Essential role for p2t(ac) and alpha(2a) receptors. *Journal of Biological Chemistry*. 1999 Oct;274(41):29108–29114.
 138. Pennock ND, White JT, Cross EW, Cheney EE, Tamburini BA, Kedl RM. T cell responses: Naïve to memory and everything in between. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education*. 2013 Dec;37(4):273–283.
 139. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. 1999 Feb;6(2):99–104.
 140. Raposo G, Stahl PD. Extracellular vesicles: a new communication paradigm? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Sep;20(9):509–10.
 141. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*. 2013 Feb;200(4):373–83.
 142. Remer KA, Brcic M, Jungi TW. Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. *Immunology letters*. 2003 Jan;85(1):75–80.
 143. Rhys HI, Dell’Accio F, Pitzalis C, Moore A, Norling LV, Perretti M. Neutrophil Microvesicles from Healthy Control and Rheumatoid Arthritis Patients Prevent the Inflammatory Activation of Macrophages. *EBioMedicine*. 2018 Mar;29:60–69.
 144. Richter J, Ng-Sikorski J, Olsson I, Andersson T. Tumor necrosis factor-induced degranulation in adherent human neutrophils is dependent on CD11b/CD18-integrin-triggered oscillations of cytosolic free Ca²⁺. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990 Dec;87(23):9472–6.
 145. Rosales C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? [Internet]. Vol. 9. *Frontiers*; 2018. 113 p. Consulté sur <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.00113/full>
 146. Sadallah S, Eken C, Schifferli JA. Ectosomes as modulators of inflammation and immunity. *Clinical and experimental immunology*. 2011 Jan;163(1):26–32.
 147. Samuelsson B. An Elucidation of the Arachidonic Acid Cascade Discovery of Prostaglandins, Thromboxane and Leukotrienes. *Drugs*. 1987;33(Supplement 1):2–9.
 148. Sapirstein A, Spech RA, Witzgall R, Bonventre JV. Cytosolic phospholipase A2 (PLA2), but not secretory PLA2, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in kidney epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Aug;271(35):21505–21513.

149. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*. 2004 Feb;75(2):163–189.
150. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2014 Aug;25(4):453–472.
151. Shen B, Wu N, Yang J-M, Gould SJ. Protein Targeting to Exosomes/Microvesicles by Plasma Membrane Anchors. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Apr;286(16):14383–14395.
152. Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, et al. TAB1: An Activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta Signal Transduction. *Science*. 1996 May;272(5265):1179–1182.
153. Shifrin DA, Demory Beckler M, Coffey RJ, Tyska MJ, Tyska MJ. Extracellular vesicles: communication, coercion, and conditioning. *Molecular biology of the cell*. 2013 May;24(9):1253–9.
154. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis [Internet]. Vol. 127. 2016. 2173–2181 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27002116>
155. Simard FA, Cloutier A, Ear T, Vardhan H, McDonald PP. MEK-independent ERK activation in human neutrophils and its impact on functional responses. *Journal of Leukocyte Biology*. 2015 Oct;98(4):565–573.
156. Simon HU. Evidence for a pro-apoptotic function of CD137 in granulocytes. *Swiss medical weekly*. 2001 Aug;131(31–32):455–8.
157. Simon H-U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunological Reviews*. 2003 Jun;193(1):101–110.
158. Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner W-D. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules*. 2015 May 4;5(2):702–23.
159. Stuchell-Brereton MD, Skalicky JJ, Kieffer C, Karren MA, Ghaffarian S, Sundquist WI. ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases. *Nature*. 2007 Oct;449(7163):740–744.
160. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease [Internet]. Vol. 31. Elsevier; 2010. 318–324 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20620114>

161. Sylvain-Prevost S, Ear T, Simard FA, Fortin CF, Dubois CM, Flamand N, et al. Activation of TAK1 by Chemotactic and Growth Factors, and Its Impact on Human Neutrophil Signaling and Functional Responses. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2015 Dec;195(11):5393–403.
162. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of Leukocyte Biology*. 1996 Feb;59(2):229–240.
163. Tamassia N, Bianchetto-Aguilera F, Arruda-Silva F, Gardiman E, Gasperini S, Calzetti F, et al. Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the “dark side of the moon.” *European Journal of Clinical Investigation*. 2018 Nov;48:e12952.
164. Tatsiy O, McDonald PP. Physiological Stimuli Induce PAD4-Dependent, ROS-Independent NETosis, With Early and Late Events Controlled by Discrete Signaling Pathways. *Frontiers in Immunology*. 2018 Sep;9:2036.
165. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: Facts beyond expression [Internet]. Vol. 5. Frontiers Media SA; 2014. 508 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25374568>
166. Teis D, Saksena S, Emr SD. Ordered Assembly of the ESCRT-III Complex on Endosomes Is Required to Sequester Cargo during MVB Formation. *Developmental Cell*. 2008 Oct;15(4):578–589.
167. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Aug;289(32):22258–22267.
168. Timár CI, Lorincz AM, Csépanyi-Kömi R, Vályi-Nagy A, Nagy G, Buzás EI, et al. Antibacterial effect of microvesicles released from human neutrophilic granulocytes. *Blood*. 2013 Jan;121(3):510–8.
169. Tricarico C, Clancy J, D’Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles [Internet]. Vol. 8. 2017. 220–232 p. Consulté sur <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21541248.2016.1215283>
170. Turbica I, Gallais Y, Gueguen C, Tharinger H, Al Sabbagh C, Gorges R, et al. Ectosomes from neutrophil-like cells down-regulate nickel-induced dendritic cell maturation and promote Th2 polarization. *Journal of Leukocyte Biology*. 2015 Apr;97(4):737–49.
171. Vargas A, Roux-Dalvai F, Droit A, Lavoie J-P. Neutrophil-Derived Exosomes: A New Mechanism Contributing to Airway Smooth Muscle Remodeling. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2016 Sep;55(3):450–461.
172. Vargas A, Zhou S, Éthier-Chiasson M, Flipo D, Lafond J, Gilbert C, et al. Syncytin

- proteins incorporated in placenta exosomes are important for cell uptake and show variation in abundance in serum exosomes from patients with preeclampsia. *The FASEB Journal*. 2014 Aug;28(8):3703–3719.
173. Verderio C, Gabrielli M, Giussani P. Role of sphingolipids in the biogenesis and biological activity of extracellular vesicles. *J Lipid Res*. 2018 Aug;59(8):1325–40.
 174. Vinokurov MG, Iurinskaia MM, Dolgacheva NN, Pechatnikov VA. Apoptosis dynamics in human neutrophils induced by ultraviolet C irradiation during lipopolysaccharide and zinc exposure. *Biofizika*. 46(6):1150–2.
 175. Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*. 2001 Jul;412(6844):346–351.
 176. Wang J. Neutrophils in tissue injury and repair [Internet]. Vol. 371. Springer; 2018. 531–539 p. Consulté sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29383445>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5820392>
 177. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, et al. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology*. 2009 Jan;184(2):205–213.
 178. Watford WT, Moriguchi M, Morinobu A, O’Shea JJ. The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003 Oct;14(5):361–368.
 179. Wei H, Malcor J-DM, Harper MT. Lipid rafts are essential for release of phosphatidylserine-exposing extracellular vesicles from platelets. *Scientific Reports*. 2018 Dec;8(1):9987.
 180. Wu Y, Tibrewal N, Birge RB. Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in cell biology*. 2006 Apr;16(4):189–97.
 181. Yang B, Stjepanovic G, Shen Q, Martin A, Hurley JH. Vps4 disassembles an ESCRT-III filament by global unfolding and processive translocation. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2015 Jun;22(6):492–498.
 182. Yetter A, Uddin S, Krolewski JJ, Jiao H, Yi T, Platanias LC. Association of the Interferon- dependent Tyrosine Kinase Tyk-2 with the Hematopoietic Cell Phosphatase. *J Biol Chem*. 1995 Aug 4;270(31):18179–82.
 183. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BNV, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine*. 2012 Sep;18(9):1386–1393.

184. Yipp BG, Kubes P. NETosis: How vital is it? [Internet]. Vol. 122. American Society of Hematology; 2013. 2784–2794 p. Consulté sur <http://www.bloodjournal.org/content/122/16/2784.long?sso-checked=true>
185. Yousefi S, Simon H-U. SHP-1: a regulator of neutrophil apoptosis. *Seminars in Immunology*. 2003 Jun;15(3):195–199.
186. Zhai L, Zhao J, Zhao M, Chen Y, Zhang L. Encapsulation and Releasing of Calcein by Spontaneously Formed Zwitterionic/Anionic Vesicle without Separation. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2007 Mar;28(3):455–61.
187. Zhang J, Clark K, Lawrence T, Peggie MW, Cohen P. An unexpected twist to the activation of IKK β : TAK1 primes IKK β for activation by autophosphorylation. *Biochemical Journal*. 2014 Aug;461(3):531–537.
188. Zmigrodzka M, Guzera M, Miśkiewicz A, Jagielski D, Winnicka A. The biology of extracellular vesicles with focus on platelet microparticles and their role in cancer development and progression. *Tumor Biology*. 2016 Nov;37(11):14391–14401.
189. Figure 1. utilisée avec la permission de Audrey Quirion (2019).
190. Figure 7. utilisée avec la permission de Audrey Quirion (2019).
191. Figure 8. reprinted from *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.47, Nicolas Chiaruttini et Aurélien Roux, Dynamic and elastic shape transitions in curved ESCRT-III filaments, p.126-135, Copyright (2017), with permission from Elsevier.